

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
DESENVOLVIMENTO DA REGIÃO CENTRO-OESTE

VALTER JOSE DA SILVA

EFEITO ANTICÂNCER *IN VIVO* E *IN VITRO* DO
ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DA FOLHA DA
GUAVIRA

CAMPO GRANDE
2024

EFEITO ANTICÂNCER *IN VIVO* E *IN VITRO* DO ÓLEO
ESSENCIAL EXTRAÍDO DA FOLHA DA GUAVIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região CentroOeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

Linha de Pesquisa: A biodiversidade do Pantanal e Cerrado e suas relações e aplicações na saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Bogo

CAMPO GRANDE

2024

FOLHA DE APROVAÇÃO

VALTER JOSE DA SILVA

EFEITO ANTICÂNCER *IN VIVO* E *IN VITRO* DO ÓLEO
ESSENCIAL EXTRAÍDO DA FOLHA DA GUAVIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Bogo

Resultado _____

Campo Grande (MS), 04 de setembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Danielle Bogo

Instituição: UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Luciana Miyagusku

Instituição: UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Antonio Pancrácio de Souza

Instituição: UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dra. Rita de Cassia Avellaneda Guimarães

Instituição: UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Nesta jornada de construção da minha dissertação de mestrado, destaquei a importância de reconhecer que, mesmo sendo um processo solitário, envolve contribuições pessoas que por muitas vezes por eles passamos de forma indiferente. Agradeço primeiramente a Deus que em minha ótica é o mais sábio dos professores. Minha especial gratidão à Professora Doutora Danielle Bogo pelo magnífico trabalho nesta orientação do início até a conclusão deste mestrado, compartilhando conhecimentos ímpares para o desenvolvimento do projeto.

Obrigado a AGRAER (Agência De Desenvolvimento Agrário Extensão Rural) por fornecer e permitir a coleta das folhas da planta, fundamental para o desenvolvimento e resultados deste trabalho.

Minha Sincera gratidão a UNIGRAN (Universidade da Grande Dourados) pelo empréstimo de equipamentos para extração de óleo essencial.

Gratidão a Prof. Dr^a.Erica do laboratório de química da UFMS, pela identificação dos elementos do óleo e realização do perfil cromatográfico.

Muito obrigado a Dr^a Nídia em sua orientação para a elaboração do creme para a fase do tratamento tópico dos animais no período experimental.

Gratidão especial à Dr^a Jéssica Muller pela em colaboração sempre que precisei.

Agradeço aos técnicos de laboratórios dentre os quais destaco a Iluska Senna Moslaves do Lab Far, Marcio do DTA, Magali da Cultura de células, que por muitas vezes dedicaram parte de seu valioso tempo na colaboração da pesquisa, Agradeço em especial ao meu filho Gustavo Vidigal Da Silva e a minha esposa Lucy Vidigal que estiveram ao meu lado neste período carregando o peso da responsabilidade sem me abandonar .O meu sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Desejo

*Desejo primeiro que você ame,
E que amando, também seja amado.
E que se não for, seja breve em esquecer.*

*E que esquecendo, não guarde mágoa.
Desejo, pois, que não seja assim,
Mas se for, saiba ser sem
desesperar.*

*Desejo também que tenha amigos,
Que mesmo maus e inconsequentes,
Sejam corajosos e fiéis,
E que pelo menos num deles
Você possa confiar sem duvidar.
E porque a vida é assim,*

*Desejo ainda que você tenha inimigos.
Nem muitos, nem poucos,
Mas na medida exata para que, algumas vezes, Você
se interpele a respeito de suas próprias certezas. E
que entre eles, haja pelo menos um que seja justo,
para que você não se sinta demasiado seguro.*

*Desejo depois que você seja útil,
mas não é insubstituível.
E que nos maus momentos,
Quando não restar mais nada, essa utilidade
seja suficiente para manter você de pé.*

*Desejo ainda que você seja tolerante,
Não com os que erram pouco, porque isso é fácil,
Mas com os que erram muito e irremediavelmente,
E que fazendo bom uso dessa
tolerância, você sirva de exemplo aos outros.*

*Desejo que você, sendo jovem,
Não amadureça depressa demais,
E que sendo maduro,
não insista em rejuvenescer
E que sendo velho,
não se dedique ao desespero.
Porque cada idade tem o seu prazer e a sua dor e
É preciso deixar que eles escorram por entre nós.*

*Desejo por sinal que você seja triste,
Não o ano todo, mas apenas um dia.
Mas que nesse dia descubra
Que o riso diário é bom,
O riso habitual é insosso
e o riso constante é insano.*

*Desejo que você descubra,
Com o máximo de urgência,
Acima e a respeito de tudo,
que existem oprimidos, Injustiçados e infelizes,
e que estão à sua volta.*

*Desejo ainda que você afague um gato,
Alimente um cuco e ouça o João-de-Barro
Erguer triunfante o seu canto matinal porque,
assim, você se sentirá bem por nada.*

*Desejo também que você plante uma semente,
Por mais minúscula que seja,
E acompanhe o seu crescimento,
Para que você saiba de quantas
Muitas vidas é feita uma árvore.*

*Desejo, outrossim, que você tenha dinheiro,
porque é preciso ser prático.*

*E que pelo menos uma vez por ano
coloque um pouco dele
Na sua frente e diga ;Isso é meu;, Só para que
fique bem claro quem é o dono de quem.*

*Desejo também que nenhum de seus afetos morra,
Por ele e por você,
mas que se morrer,
você possa chorar sem se lamentar e sofrer sem se culpar.*

*Desejo por fim que você sendo homem,
Tenha uma boa mulher,
E que sendo mulher,
Tenha um bom homem
E que se amem hoje, amanhã e nos dias
seguintes,
E quando estiverem exaustos e
sorridentes, ainda haja amor para recomeçar.
E se tudo isso acontecer,
Não tenho mais nada a te desejar.*

Victor Hugo

RESUMO

A *Campomanesia adamantium*, é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro. Conhecida como fonte natural de compostos fenólicos, possui promissoras atividades biológicas. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade *in vitro* do óleo essencial das folhas da guavira frente a linhagens de células imortalizadas não tumorais e em linhagem tumoral bem como *in vivo*, utilizando o modelo experimental de melanoma murino, em camundongos BALB/C. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e sua composição química realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). A atividade citotóxica do óleo essencial foi avaliada *in vitro* em linhagem neoplásica células B16F10, em células normais (fibroblastos murinos 3T3 e células endoteliais de cordão umbilical humano - HUVEC). Para o desenvolvimento do nódulo hipodérmico, suspensões de células B16 F10 foram inoculadas subcutaneamente na região interescapular dos animais. No 10º dia após a inoculação os animais foram distribuídos em grupos: Grupo 1 (Controle, apenas células B16F10), Grupo 2 e 3 (óleo essencial de guavira via Gavagem 200 e 300mg/kg), Grupo 4 e 5 (óleo essencial de guavira via I.P 200 e 300ug/ml), Grupo 6 (Doxorrubicina 5mg/kg), Grupo 7 (óleo essencial de guavira via (I.P 45mg/ml) e Grupo 8 (óleo essencial de guavira 3%, via tópica). A toxicidade aguda do óleo essencial da folha da guavira foi baseada na OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) – *Guidelines* 423. Os resultados obtidos no perfil químico apontaram 32 substâncias no óleo essencial. O biciclogermacreno (16,86%), linalol (7,01%), germacreno D (7,14%), E-cariofileno (6,38%), limoneno (5,39%) e α -terpineol (4,70%) aparecem em maior percentual. O óleo apresentou baixa citotoxicidade apresentando GI50 < 250 μ g/mL (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) e para a linhagem neoplásica B16F10 a GI50 encontrada foi de 2,85 μ g/mL. O índice de seletividade que indica quantas vezes o óleo foi seletivo para linhagem neoplásica foi de 87.71, indicando alta seletividade do óleo. No ensaio *in vivo*, os grupos tratados via gavagem (300 mg/kg) e via tópica (3%), apresentaram redução do peso tumoral, quando comparados ao controle (Grupo 1) 87,56% e 87,93% respectivamente. No ensaio de toxicidade oral aguda houve sinais de intoxicação bem evidentes na dose mais elevada (2000mg/kg). Os camundongos tratados com 300 mg/kg apresentaram sinais moderados de intoxicação, porém, nas doses de

50mg/kg e 5 mg/kg não houve alteração de comportamento, indicando baixa toxicidade.

Palavras- chave: Campomanesia adamantium, óleo essencial, melanoma, B16F10

ABSTRACT

Campomanesia adamantium is a native species of the Brazilian Cerrado. Known as a natural source of phenolic compounds, it has promising biological activities. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* activity of the essential oil from guavira leaves against immortalized non-tumor cell lines and tumor cell lines, as well as *in vivo*, using the experimental model of murine melanoma in BALB/C mice. The essential oil was extracted by hydrodistillation and its chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The cytotoxic activity of the essential oil was evaluated *in vitro* in neoplastic B16F10 cell lines and in normal cells (murine 3T3 fibroblasts and human umbilical cord endothelial cells - HUVEC). For the development of the hypodermic nodule, suspensions of B16F10 cells were inoculated subcutaneously in the interscapular region of the animals. On the 10th day after inoculation, the animals were distributed into groups: Group 1 (Control, only B16F10 cells), Groups 2 and 3 (guavira essential oil via Gavage 200 and 300mg/kg), Groups 4 and 5 (guavira essential oil via I.P 200 and 300ug/ml), Group 6 (Doxorubicin 5mg/kg), Group 7 (guavira essential oil via (I.P 45mg/ml) and Group 8 (guavira essential oil 3%, topical). The acute toxicity of the guavira leaf essential oil was based on the OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) – Guidelines 423. The results obtained in the chemical profile indicated 32 substances in the essential oil. Bicyclogermacrene (16.86%), linalool (7.01%), germacrene D (7.14%), E-caryophyllene (6.38%), limonene (5.39%) and α -terpineol (4.70%) appeared in the highest percentage. The oil showed low cytotoxicity, with GI50 < 250 μ g/mL (concentration capable of inhibiting 50% of cell growth), and for the neoplastic lineage B16F10, the GI50 found was 2.85 μ g/mL. The selectivity index, which indicates how many times the oil was selective for the neoplastic lineage, was 87.71, indicating high selectivity of the oil. In the *in vivo* assay, the groups treated via gavage (300 mg/kg) and topical (3%) showed a reduction in tumor weight when compared to the control (Group 1) of 87.56% and 87.93%, respectively. In the acute oral toxicity assay, there were clearly evident signs of intoxication at the highest dose (2000 mg/kg). Mice treated with 300 mg/kg showed moderate signs of intoxication, however, at doses of 50 mg/kg and 5 mg/kg there was no change in behavior, indicating low toxicity.

Keyword: *Campomanesia adamantium*, essential oil, melanoma, B16F10

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios da morfologia celular e tecidual antecedentes ao câncer.

Figura 2. Estágios de desenvolvimento do câncer de pele melanoma.

Figura 3 Folha e fruto da Guavira (*Campomanesia adamantium*).

Figura 4 - Clevenger (extrator do óleo essencial)

Figura 5 - Representação da placa de 96 poços.

Figura 6 - Óleo essencial da folha da Guavira obtido por hidrodestilação

Figura.7- perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas da guavira, in natura.

Figura.8 – Peso tumoral (mg)

Figura.9 – Volume Tumoral (cm³)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C.A	<i>Campomanesia adamantium</i>
ATCC	CRLFibroblasto murino
ATCC CRL	– Células endoteliais de cordão umbilical
CPM	Câncer de Pele Melanoma
CPNM	Câncer de Pele Não Melanomaalter
FDA	Food and Drug Administration
GI50	Inibição do crescimento de 50% das células
HE	ematoxilina-eosina
IAP	Inibidores da Apoptose
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IS	Índice de seletividade
I.P	intraperitoneal
AGRAER	Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural
INCA	Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MTT	3-brometo (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio.
NPs	Produtos naturais
OMS	organização Mundial da Saúde
OE	Óleo essencial
PBS:	Tampão fosfato de salina SC subcutânea
SFB	Soro Fetal Bovino
SBF	Sulforodamina
B T0	Tempo zero
UV	ultravioleta
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
µg/mL	Micrograma por mililitro
CN	Controle Negativo
DOX	Doxorrubicina
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos derivados de plantas utilizados na terapia do câncer.

Tabela 2. Substâncias identificadas no óleo da folha da guavira (*Campomanesia* sp.)

Tabela 3. Valores encontrados de GI50* ($\mu\text{g/mL}$) para doxorubicina (controle positivo) e óleo de guavira em linhagens de células normais

Tabela 4. Valores encontrados de GI50* para a doxorubicina (controle positivo) e o óleo de guavira em linhagem B16F10..

Tabela 5. Valores referentes ao peso e volume tumoral dos nódulos obtidos dos grupos tratados com óleo essencial de guavira

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Avaliação do grupo (C) e tratado (T) com 2000mg/kg em relação ao tempo em horas (H) e dias (D).

Quadro 2. Avaliação do grupo (C) e tratado (T) com 300mg/kg em relação ao tempo em horas (H) e dias (D).

Avaliação do grupo (C) e tratado (T) com 50mg/kg em relação ao tempo em horas (H) e dias (D).

Quadro 4. Avaliação do grupo (C) e tratado (T) com 5 mg/kg em relação ao tempo em horas (H) e dias (D).

SUMÁRIO

1 Introdução	17
2 Revisão Bibliográfica	19
2.1 Câncer	19
2.2 Câncer De Pele.....	21
2.3 Tratamento.....	24
2.4 Produtos Naturais	25
2.5 Campomanesia adamantium	28
2.6 Óleo Essencial	30
2.7 Cultura De Células.....	31
2.8 Modelo experimental de melanoma murino <i>in vivo</i>	32
3 Objetivos	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 Metodologia	34
4.1 Obtenção do óleo essencial das folhas da guavira (<i>Campomanesia Adamantium</i>).....	34
4.2 Método de extração do óleo essencial.....	34
4.3 Perfil químico do óleo essencial da guavira	35
4.4 Ensaio de Citotoxicidade.....	36
4.5 Atividade anticâncer in vitro do óleo.....	38
4.6 Cálculo do índice de seletividade do óleo essencial de guavira	38
4.7 Toxicidade oral aguda.....	39
4.8 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> do óleo essencial em modelo experimental de melanoma murinho.....	40
4.8.1 Desenvolvimento do melanoma experimental murino <i>in vivo</i>	40
4.9 Análise de Dados	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

5.1 Obtenção do óleo essencial das folhas da guavira (<i>Campomanesia Adamantium</i>).....	41
5.2 Perfil químico do óleo essencial da guavira	43
5.3 Citotoxicidade	46
5.4 Atividade anticâncer in vitro do óleo.....	47
5.5 Cálculo do índice de seletividade do óleo essencial de guavira	48
5.6 Avaliação da toxicidade do óleo da guavira	49
5.7 Avaliação da atividade antitumoral em melanoma murino	55
6 Conclusões	60
7 Considerações finais.....	61
8 Referências.....	62

1 Introdução

A Organização Mundial da Saúde estima que o câncer cause anualmente a morte de 9,6 milhões de pessoas diagnosticadas com a doença. Apesar da redução na incidência de alguns tipos de câncer em países em ascensão, o número de casos apresenta crescimento expressivo nos últimos anos (SUNG, et al., 2021).

Neoplasia, câncer ou tumor se referem a massas teciduais anormais, resultantes de um crescimento autônomo e gradual. Esses termos são sinônimos que descrevem um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento celular desordenado e pela resistência das células à morte, levando ao desenvolvimento de tumores malignos. O processo de formação do câncer é conhecido como carcinogênese, que envolve a ação de agentes cancerígenos ao longo do tempo, resultando na difusão e progressão do tumor. O câncer é um dos principais responsáveis por óbitos na população humana, surge por múltiplos fatores, emergindo como desafio para a saúde pública (TORRE et al., 2016; BRAY et al., 2018).

Os cânceres com maior grau de letalidade estão associados a pulmão, estômago, fígado, cólon e mama.

De origem grego, o câncer significa karkinos e do latim câncer, que significa caranguejo, pela semelhança dos vasos sanguíneos presente em tumores de mama, com as pernas do crustáceo, associação feita pelo médico Hipócrates por volta do ano 400 a.C. (HAUSMAN, 2019). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) as perspectivas são de mais de 35 milhões de novos casos de câncer em 2050, um aumento de 77% em relação aos 20 milhões de casos estimados em 2022. (OPAS) Organização Pan Americana da Saúde. Em 2020 aproximadamente, 10 milhões de óbitos por câncer foram registrados de um total de 19,3 milhões de novos casos diagnosticados. (OMS) Organização mundial de saúde. No Brasil, o câncer é tratado como um problema de saúde pública, sendo as neoplasias malignas a segunda causa de óbitos por doenças.

O câncer tem apresentado grande incidência na população brasileira, impactando fatores sociais e econômicos (INCA, 2020; SILVA, et al., 2019; SANTOS, MACIEL, OLIVEIRA, 2020). O Instituto Nacional do Câncer prevê cerca de 704 mil casos anuais no período entre 2023 e 2025, conforme dados publicados na Estimativa 2023 – INCA Incidência de Câncer no Brasil.

Estima-se que em 2025, o número de casos novos de câncer no mundo alcance a ordem de 20 milhões, e 80% desses casos ocorrerão em países em desenvolvimento (WILD, STEWART, 2014). Fatores como envelhecimento, estilo de vida e meio social, como tabagismo, alcoolismo, exposição a radiações ionizantes, radiação solar são alguns dos fatores de risco externos que contribuem para o aparecimento do câncer, além dos fatores genéticos (INCA, 2021; ALMEIDA, et al., 2017).

O câncer é um constante desafio para o sistema de saúde pública mundial. Há um crescente interesse em pesquisas por novos agentes terapêuticos que contribuam na prevenção, controle e desenvolvimento da doença (WHO, 2014). O tumor maligno com maior incidência no Brasil é o câncer de pele não melanoma (31,3% do total de casos), seguido pelos de mama feminina (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%), Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2023). Nesta linhagem existem dois grupos distintos classificados como, câncer de pele não melanoma (CPNM) e câncer de pele melanoma (CPM). O câncer de pele não melanoma (CPNM) corresponde a 90% dos cânceres de pele, apresenta tumores de diferentes linhagens, sendo estas CBC (carcinoma basocelular) e CEC (carcinoma epidermóide), é mais frequente, menos agressivo, já o melanoma é de menor frequência, maior agressividade e representa 3% dos cânceres cutâneos, evidenciando uma menor incidência que os carcinomas basocelular e epidermóide, mas com elevado potencial metastático podendo ser letal (INCA, 2015).

O melanoma é uma neoplasia originada pela transformação maligna dos melanócitos com proliferação descontrolada, são células produtoras de melanina da camada basal da epiderme, derivadas embriologicamente da crista neural. Pesquisas sobre avanço tumoral indicam que o melanoma se origina por hiperplasia dos melanócitos e posteriormente displasia, evoluindo para neoplasia (BRECHTBUHL, 2014).

A prática de cultivar células in vitro permite a realização de ensaios biológicos como testes de citotoxicidade e de biologia molecular, auxiliando na busca por compostos mais seletivos com efeitos colaterais reduzidos, atuando em diferentes pontos no tratamento de neoplasias. Esse método utilizado evidencia o efeito dos compostos sobre as células cultivadas e através dos resultados obtidos, há a possibilidade de descoberta de novos compostos bioativos (FRESHNEY, 2016).

Na avaliação da atividade antiproliferativa, os testes de citotoxicidade *in vitro* com células neoplásicas são os mais utilizados (DE SOUZA, 2019). Neste ensaio é possível avaliar muitas substâncias em curto espaço de tempo, permitindo explorar novos agentes anticâncer (SCHMITT et al., 2018).

Segundo Smith e colaboradores (2005), o modelo *in vivo* é importante para confirmar a atividade anticâncer presente em cultura de células, superando as limitações dos modelos *in vitro* permitindo a avaliação de substâncias quanto ao seu potencial anticâncer (JUNQUEIRA, 1997; NAKAMURA et al., 2002).

A presente pesquisa avaliou a atividade *in vitro* do óleo essencial da folha da guavira frente a linhagens de células imortalizadas não tumorais 3T3 (fibroblasto murino) (ATCC CRL-1658) e HUVEC (células endoteliais de cordão umbilical) (ATCC CRL-1730) e em B16F10 (melanoma murino) bem como *in vivo*, utilizando o modelo experimental de melanoma murino, em camundongos BALB/C.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Câncer

O câncer é um termo usado comumente para designação de um conjunto de mais de 100 doenças e que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem órgãos e tecidos adjacentes de maneira agressiva e com rápida reprodução levando a formação de tumores malignos. Na língua grega, a palavra significa "caranguejo", devido à aparência do tumor, que lembra as pernas do crustáceo em razão do formato de vasos sanguíneos ao seu redor. Em 1930, Rupert Willis definiu neoplasia como uma massa anormal de tecido cujo crescimento é mais rápido quando comparado ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo após a interrupção dos estímulos que a originaram (KUMAR et al., 2013).

O câncer tem origem de uma série de mudanças genéticas e epigenéticas, normalmente relacionadas ao DNA, que afetam a expressão genética (BARROSO, et al., 2020). O desenvolvimento do câncer ocorre através de complicações metabólicas e sinalização em células com falhas no sistema imunológico. Esse processo passa por diversas etapas que envolvem mutação e seleção de células com capacidade cada vez maior de se proliferar, sobreviver, invadir e se espalhar para outras partes do corpo (INCA, 2022).

O câncer é considerado como a segunda principal causa de óbitos em todo o mundo (DE SOUZA et al., 2023). Segundo dados da OMS, cerca de 9,6 milhões de pessoas morrem anualmente em decorrência do câncer, podendo nos próximos 25 anos, ser esta a principal causa de óbitos no planeta. Mesmo com recentes avanços em pesquisas sobre as causas do câncer de pele, a incidência do melanoma cresceu na última década (LANCETA et al., 2021) em muitos casos as terapias aplicadas não conseguem êxito eficaz sobre os mecanismos adaptativos que conduzem o melanoma, principalmente em casos metastáticos (BRITO et al., 2020). Por diversas razões, essas células podem ter origem endógena, ou seja, aquelas que são geneticamente predispostas, ligadas à capacidade do corpo de se proteger contra agressões externas e fatores exógenos relacionados ao ambiente social, cultural, hábitos pessoais e meio ambiente, os quais variam de pessoa para pessoa. Em certos casos, esses elementos se relacionam entre si, e estas relações aumentam a probabilidade de células saudáveis se transformem em células malignas, assim sendo, o câncer se configura como uma doença causada por múltiplos fatores (SONDAK et al., 2004).

Estima-se que os tipos de câncer com maiores incidentes nos próximos anos, exceto o de pele do tipo não melanoma, serão os de próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral, no sexo masculino, já no sexo feminino, os de mama, intestino, colo do útero, pulmão e estômago, acompanhando o mesmo perfil de magnitude mundial (INCA, 2023).

A estratégia na busca de novos medicamentos para tratar o câncer passou por mudanças devido aos avanços na biologia molecular. Antes, muitos compostos descobertos inicialmente interagiam com o DNA ou seus precursores, inibindo a produção de novo material genético e danificando o DNA sem distinguir células cancerígenas e saudáveis. Com o progresso da biologia molecular, surgiram alvos mais específicos, como receptores de fatores de crescimento, vias de sinalização intracelular, defeitos no reparo do DNA e vias de morte celular. Apesar das evoluções, a resistência aos medicamentos resultante de transformações farmacocinética e molecular ainda é um grande obstáculo no tratamento do câncer (DURÁN et al., 2016).

De maneira geral, os principais métodos de tratamento contra o câncer concentram-se nos procedimentos de quimioterapia, radioterapia e cirúrgicos. Com notória evolução, existem diversos tipos de câncer sem tratamento específico devido aos efeitos adversos, resistência farmacológica e baixa seletividade dos medicamentos às células neoplásicas, o que aumenta o risco de toxicidade causada pelo tratamento. Em estágios avançados da doença, é comum a interrupção do tratamento, pois os efeitos colaterais intensos da quimioterapia podem superar os benefícios e o aumento da sobrevida não é acompanhado pela melhora da qualidade de vida (KAMB, 2005; COSTA-LOTUFO et al., 2010.; BATISTA et al., 2015).

Desta forma torna-se imprescindível a necessidade de uso por métodos alternativos, terapêuticas mais eficientes e seletivas às células neoplásicas que atuem em diferentes alvos, é uma urgente realidade, a fim de aprimorar os protocolos terapêuticos voltados ao tratamento do câncer.

2.2 Câncer De Pele

O câncer de pele é o tipo de neoplasia mais frequente em todo o mundo e com maior índice de abrangência nas populações de pele clara (PIRES et al., 2018).

O câncer de pele se apresenta basicamente de dois tipos distintos: Câncer de pele melanoma (CPM) e câncer de pele não melanoma (CPNM). CPNM é o mais comum, tem crescimento lento, é de maior incidência, e raramente causa metástase, em contexto geral apresenta bom prognóstico com elevado índice de cura se tratado corretamente, enquanto o CPM tem menor incidência, é mais agressivo e apresenta grande resistência em todas as modalidades atuais de terapia podendo chegar a letalidade (DE VRIES et al., 2012).

O melanoma pode se desenvolver nas células produtoras de pigmento dos olhos, trato gastrointestinal, órgãos genitais, seios paranasais e meninges, mas ocorre mais comumente na pele em associação a um contexto de lesão UV (NCI-SEER, 2016). As radiações ultravioletas (UV) A e B contribuem para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer de pele, incluindo o melanoma, e aproximadamente 80% dos casos de melanoma estão associados a esta exposição, especialmente em pessoas caucasianos e/ou com graus variados de sardas (DE CEBALLOS et. al., 2014; INCA, 2015).

Identifica-se o câncer de pele através de uma avaliação mediante o aparecimento de manchas anormais na pele onde estas são avaliadas quanto à cor, tamanho, forma ou textura e se necessário, parte desta lesão de aspecto alterado é coletada e enviada a um patologista para biópsia, conforme apresentado na Figura 1 (HURWITZ, et al., 2016)



Figura 1. - Características do câncer de pele melanoma

Fonte: <https://www.cancer.gov/>

É visto como um importante sinal de alerta, uma vez que o paciente que teve este tipo de lesão de câncer de pele não melanoma (CPNM), tem uma maior probabilidade de desenvolver um novo câncer de pele. Algumas pesquisas apontam que ter histórico individual de câncer de pele do tipo não melanoma eleva em 35% o risco do aparecimento de outro câncer do mesmo tipo em três anos e 50% em cinco anos após o primeiro diagnóstico. Portanto, é importante que indivíduos que tiveram lesão de CPNM sejam monitorados regularmente, garantindo um prévio diagnóstico e tratamento eficaz mediante o surgimento de novo ferimento. O melanoma é a quinta forma de câncer mais comum entre adultos (homens e mulheres) e também o tipo mais letal de câncer de pele (COSTA, LINS, DA SILVA, 2023).

Outros fatores como idade, sexo e suscetibilidade individual também apresentam relação com o desenvolvimento desse tipo de câncer. Aproximadamente 20-30% dos CPM estão associados à presença de nevos melanocítico pré-existent. Além disso, histórico familiar e melanoma prévio também estão associados ao aumento do risco no aparecimento desse câncer, entre outros fatores genéticos (DE MELANOMA, G. B., 2017). Diante do diagnóstico, exames são realizados para determinar o estágio da doença (0 – IV), são observados sinais como: hábitos de vida do paciente, doenças progressas e terapias efetuadas. Também é feito o mapeamento dos

linfonodos e a realização de uma biópsia do linfonodo sentinela, juntamente com exames de imagem como tomografia computadorizada do tronco, PET scan ou ressonância magnética nuclear. Esses resultados são analisados juntamente com os da biópsia do tumor para determinar o estágio do melanoma (NCI, 2017).

O melanoma é um tipo de câncer que surge a partir dos melanócitos, as células responsáveis pela produção da melanina, o pigmento que confere cor à pele. As opções de tratamento variam principalmente de acordo com o estágio da doença, mas outros aspectos, como a variedade e a localização do tumor, também desempenham um papel importante. Em estágios mais precoces, as chances de recuperação são superiores e o tratamento tende a ser menos complicado. O melanoma, quando diagnosticado em sua fase inicial, é denominada como estágio 0 (carcinoma in situ). Após esse estágio, e diante de evolução a doença é classificada nos estágios de 1 a 4, sendo que o estágio 4 representa a fase mais avançada do câncer. No Estágio 0, o tumor está contido na camada superficial da pele, não se espalhou para linfonodos próximos ou outro órgão. Esse estágio é denominado como melanoma in situ. No Estágio I, o tumor não excede o tamanho de 2 mm de espessura, porém pode ou não ter ulceração. No Estágio II, o tumor apresenta uma espessura variando de 1 a 4 mm e pode ou não apresentar ulceração. Ainda não se disseminou para os linfonodos nem para outros órgãos. No Estágio IIIA, o tumor possui uma espessura de até 2 mm podendo ou não ter ulceração. Neste estágio é possível que ele tenha se espalhado para até 3 linfonodos, porém essa metástase só é possível ser identificada com microscópio.

Considerando o Estágio IIIB, não há evidência do tumor primário e ele se disseminou para somente um linfonodo ou para pequenas áreas da pele nas proximidades (tumores satélites) ou para os canais linfáticos da pele ao redor da lesão (sem afetar os linfonodos), possuem espessura de até 4mm podendo ter ou não ulceração não houve metástase para outros órgãos.

Estágio IIIC. Uma das seguintes situações se aplica há evidência do tumor primário e ele está disseminado para 2 ou mais linfonodos, ou se espalhou para pequenas áreas da pele próximas (tumores satélites), ou para os canais linfáticos da pele ao redor do tumor, afetando os gânglios linfáticos próximos ou ainda se espalhou para

os linfonodos. Não houve metástase para outros órgãos. O tumor tem até 4 mm de espessura e pode apresentar ulceração.

Estágio IIID. O tumor possui uma espessura superior a 4 mm e apresenta ulceração e disseminação para quatro ou mais linfonodos, espalhamento para pequenas áreas da pele ou canais linfáticos ao redor do tumor (sem afetar os nódulos linfáticos)). Não houve metástase para outros órgãos.

Estágio IV. O tumor pode ter qualquer espessura e pode ou não apresentar ulceração e metástase para os linfonodos próximos, no entanto, já se espalhou para linfonodos distantes ou outros órgãos, como pulmões, fígado ou cérebro. (MUNHOZ, 2019, <https://www.cancer.org/>)

A figura abaixo (Figura 2) ilustra os estágios de desenvolvimento do tumor.

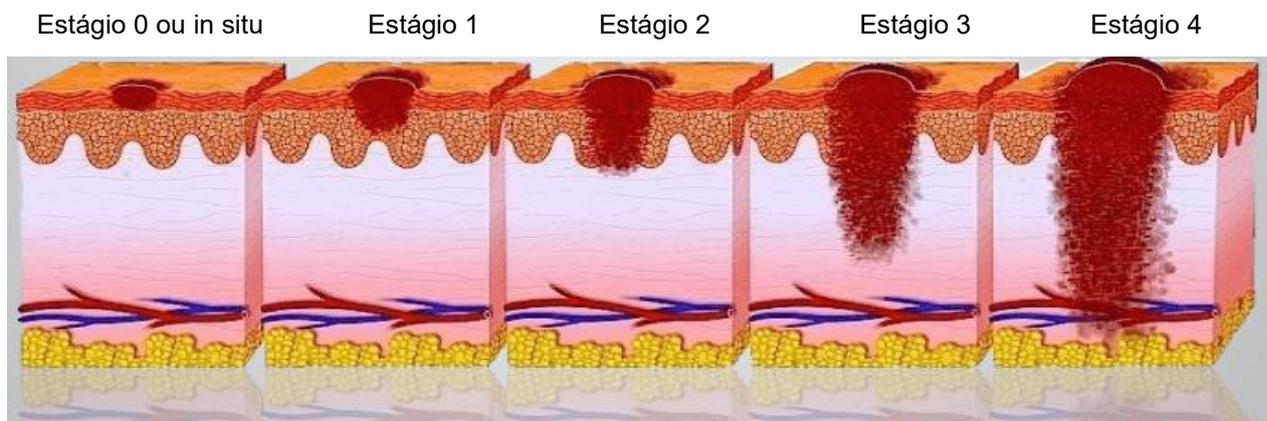


Figura 2 - Estágios de desenvolvimento do câncer de pele

Fonte: <https://www.melanomabrasil.org/>

O resultado convencional no tratamento do melanoma cutâneo metastático tem incentivado a realização de pesquisas experimentais com novos métodos. Estudos *in vitro* e *in vivo* são essenciais para uma compreensão mais aprofundada do comportamento biológico desta neoplasia, além de contribuírem para a criação de novos métodos, diagnósticos e terapias (ALSHAMSAN, 2018; HELLER et al., 2021).

2.3 Tratamento

O tratamento do câncer de pele, por excisão cirúrgica, é o principal método (NCI, 2016). A radioterapia é menos utilizada e é considerada como método alternativo caso a cirurgia não seja indicada (ERICKSON; MILLER, 2010). Em alguns

casos de melanoma em estágios II e III, pode ser sugerido o uso de interferon alfa como tratamento complementar, apesar de sua associação a elevada toxicidade. Em determinados casos de pacientes com metástases onde a cirurgia não é viável, é indicado o tratamento sistêmico através da quimioterapia (com substâncias como dacarbazina, temozolomida ou carboplatina/paclitaxel) (SIMÕES et al., 2022).

Em muitas situações, o câncer de pele pode ser evitado e um dos melhores métodos de proteção é evitar a excessiva exposição à luz solar em decorrência de seus raios ultravioleta (UV), podendo estes desencadear lesões na pele e evoluir para o câncer. O tratamento para o câncer é determinado pelas fases as quais vão desde a fase 0 até a IV. Quanto maior o grau desta fase, maior a extensão do câncer. Em algumas situações, uma biópsia pode ser suficiente, retirando todo o tecido comprometido, em caso de um câncer pequeno e superficial (DA SILVA et al., 2021).

É crucial ressaltar que pacientes que passam pelo câncer enfrentam uma variedade de efeitos adversos da doença e do seu tratamento. Alguns efeitos incluem disfunção cardiovascular, comprometimento neuromuscular, diminuição da função física, síndrome metabólica e outros aumentam a morbidade e a mortalidade associada ao câncer em geral. Em outro contexto, o número de pessoas que sobrevivem ao câncer cresceu em decorrência dos avanços nos métodos de acompanhamento e recursos terapêuticos contra o câncer, mesmo assim, enfrentam grandes desgastes físicos e psicológicos que exigem cuidados de saúde de longo prazo (DEMINICE, 2022).

2.4 Produtos Naturais

O câncer é uma das mais temidas doenças no mundo, e apresenta uma elevada taxa de letalidade. O tratamento do câncer, objetiva melhorar qualidade e sobrevida dos pacientes (FEITOSA et al., 2021). Os usos de recursos de origem naturais são praticados no tratamento de mazelas desde a antiguidade (GIORDANI et al., 2015; SANTOS-LIMA et al., 2016; CONCEIÇÃO; AOYAMA, 2016).

A utilização das plantas medicinais é uma tradição antiga, conduzida muito antes da existência da indústria farmacêutica. Essa prática consiste em observar os efeitos benéficos que umas plantas específicas proporcionaram aos animais, também em relatos de pessoas que já haviam experimentado o produto natural e alcançado resultados positivos (MATTOS et al., 2018). Os medicamentos naturais

têm a vantagem de fácil acesso comparados aos demais e apresentarem um custo-benefício vantajoso, aspecto que não se aplica aos medicamentos antineoplásicos industrializados, os quais frequentemente possuem um custo elevado. Além disso, os fitoterápicos podem potencializar os efeitos das terapias convencionais, e alguns compostos ativos podem se direcionar especificamente para as células doentes, reduzindo, assim, os efeitos colaterais do tratamento (FEITOZA et al., 2021). Os produtos naturais instituíram avanços notáveis e substanciais no controle de terapias do câncer e são reconhecidos como uma base relevante de novos compostos para o tratamento (CRAGG; PEZZUTO, 2016).

Neste sentido, diversos centros de excelência em pesquisa têm buscado o desenvolvimento de novos quimioterápicos a partir de plantas. Estudos apontam que 60% das drogas utilizadas em ensaios clínicos são derivados de produtos naturais (VIEIRA et al., 2020) e aproximadamente 80% da população global necessita destes medicamentos produzidos a partir de plantas para cuidar da saúde (ANDRADE, 2018; AMRATI et al., 2021).

Há séculos, o uso de produtos naturais com propriedades medicinais tem sido documentado (CRAGG et al., 1997; GULLO et al., 2006). A busca por produtos de fontes naturais, extratos, frações e moléculas com atividades biológicas, têm sido avaliados, resultando na descoberta de novos compostos promissores (ALVES et al., 2014). Com o avanço da tecnologia, o refinamento das técnicas de isolamento, identificação e síntese, inúmeros medicamentos foram criados a partir de recursos naturais (VIEGAS et al., 2006; MACIEL et al., 2007; CRAGG; NEWMAN, 2009).

A tabela abaixo (Tabela 1) exemplifica o uso de produtos naturais para tratamento do câncer.

Tabela 1 - Produtos naturais ou fármacos derivados de plantas na terapia do câncer

Fármacos	Fonte	Alvo Molecular	Indicação terapêutica
Vimblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina	<i>Catharanthus roseus</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking
Paclitaxel e docetaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	Tubulina/ Microtúbulos	Câncer de mama
Podofilotoxina Etoposídeoeteniposídeo	<i>Podophyllum peltatum</i>	Topoisomerase II	Câncer de Pulmão, ovário e testículo; Leucemia Linfocítica Aguda
Camptotecina	<i>Camptotheca accuminata</i>	Topoisomerase I	Câncer de colon
Irinotecano			
Topotecano			

Fonte: COSTA-LOTUFO et al., 2010.

Desde os primórdios da história, o homem sempre buscou na natureza métodos de cura para suas enfermidades (IJAZ et al., 2018). No século XX, estudos voltados para compostos naturais, sobretudo plantas e microrganismos, alcançaram um avanço surpreendente. Na oncologia, diversas substâncias foram identificadas e novos fármacos foram incorporados aos procedimentos terapêuticos (PINTO et al., 2002). Segundo Newman e colaboradores (2003), medicamentos provenientes da natureza podem tratar 87% dos problemas de saúde em humanos, inclusive o câncer. A FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos entre 1981 e 2010 aprovou 1.073 novos medicamentos, destes 64% são moléculas naturais, derivadas ou sintetizadas de compostos naturais e apenas 36% eram moléculas puramente sintéticas (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Nas últimas três décadas 80% dos medicamentos aprovados pela FDA para tratamento do câncer são produtos naturais ou têm em alguma fase da sua produção uma relação com uma fonte natural (HAQUE, BRAZEAU, AMIN 2021).

O desenvolvimento da biologia molecular e dos métodos analíticos que permitem avaliações estruturais mais detalhadas, criam oportunidades valiosas para

os estudos de produtos naturais (TRIVELLA et al., 2022). Assim, pesquisas envolvendo expressão gênica, vias de sinalização, alvos moleculares de fitoquímicos têm sido extensivamente realizadas a fim de identificar elementos promissores na cura oncológica (BISHAYEE; SETHI, 2016).

Syed et al. 2016 avaliaram a fisetina, um flavonol presente em frutas e vegetais, tais como morangos, maçã, pepino, caqui, uva e cebola, quanto a seus efeitos anticancerígenos. Além disso, indicaram relevantes recursos moleculares e propostas para futuras pesquisas a fim de facilitar o desenvolvimento clínico da fisetina como um potente agente quimiopreventivo e quimioterápico (SYED et al., 2016).

Um estudo que revisou algumas substâncias derivadas de produtos naturais utilizadas na dieta (curcumina, ercicina, capsaicina, ácido betulínico, dentre outros) constatou que tais compostos modulam múltiplos alvos oncogênicos envolvidos na iniciação e progressão do câncer de próstata. Os autores destacaram também o mérito de compostos naturais para a prevenção e terapia do câncer de próstata, e afirmaram que produtos naturais derivados de plantas comestíveis podem oferecer uma gama de benefícios em comparação com a maioria dos compostos anticancerígenos sintéticos, devido à sua grande variedade de alvos (KALLIFATIDIS et al., 2016). Dentre tantos, a *Campomanesia adamantium* aparece frequentemente com destaque em várias pesquisas devido sua variedade de compostos presentes, os quais têm demonstrado resultados positivos no tratamento de diferentes enfermidades, inclusive para o câncer (SILVA, 2023).

2.5 Campomanesia adamantium

Campomanesia adamantium pertence à família Myrtaceae, e compreende cerca de 4000 espécies e 130 gêneros distribuídos por todos os continentes, exceto na Antártica. É uma das famílias botânicas mais expressivas da flora brasileira, apresentando significativo interesse econômico para o Brasil (D'ANGELIS et al., 2014). Estudos indicam que a espécie é a segunda que mais desponta em pesquisas dentro do gênero *Campomanesia* (STECKELBERG et al. 2022).

A *Campomanesia adamantium* (Figura 3), O. Berg é conhecida popularmente no Brasil como “guavira”, “guabiroba-do-campo”, “guabiroba-do-cerrado”, “gabiroba”,

“guabiroba-lisa” e “guabiroba-branca” (CARDOSO, 2021). A espécie é caracterizada como um arbusto terrestre que atinge até 2 m de altura, folhas lisas com nervuras central com pequenos canais que camuflam substâncias químicas como óleos essenciais (RIBEIRO et al., 2020).

Em Estudos dirigidos por Coutinho e colaboradores (2010), após macerar folhas da *C. adamantium* em etanol mostraram possível antioxidantes na planta, mais tarde Pascoal et al. (2011) atribuíram estas propriedades do extrato a presença predominante de flavonoides, o que mais tarde também foi comprovado por Menezes Filho e Castro (2019).



Figura 3 - Folha e fruto da Guavira (*Campomanesia adamantium*)
Fonte: AGRAER, 2023

A *C. adamantium* tem se destacado por ser empregada no tratamento de várias doenças, exibindo atividades distintas conforme a parte utilizada. As infusões de suas folhas são tipicamente usadas no tratamento da gripe, melhoria da saúde intestinal, anti-inflamatório, antidiarreico e antisséptico das vias urinárias (RAMOS et al., 2007), hipocolesterolêmico, antirreumático e depurativo (PAVAN et al., 2009), antimicrobiano (COUTINHO et al., 2009; COUTINHO et al., 2010). De alto teor vitamínico, o fruto da *C. adamantium* é usado tradicionalmente como agente antiinflamatório (SHERWOOD; TOLIVER- KINSKY, 2004; SALMAZZO et al., 2010; PASCOAL; FAGUNDES, et al., 2014).

Segundo Valilo et al. (2006), foram encontradas substâncias com atividades farmacológicas presentes no óleo extraído do fruto da *C. adamantium*, sendo estas

os sesquiterpenos cariofileno e seu isômero α -cariofileno, os monoterpenos ocimeno, 3-careno e do Dlimoneno, sendo este último encontrado em abundância na natureza e com eficácia no tratamento quimioterápico de alguns tumores malignos da mama, próstata e pâncreas (VALILLO et al., 2006).

Estudos químico das folhas de *C. adamantium* relatou a presença de éter, aldeídos, cetonas, ésteres, epóxidos, fenóis, sendo que a grande parte é composta de álcool, hidrocarbonetos terpênicos, flavanonas e chalconas (7-hidroxi-5-metoxiflavanona, 5,7-diidroxil-6-metilflavanona, 5,7-dihidroxi-8-metilflavanona, 2',4'-diidroxil-6,8-dimetilchalcona, 2',4'-diidroxil-6'-metoxil-3'-metil chalcona, 2',4'-diidroxil-6'-metoxil-3',5'-dimetilchalcona) evidenciando uma variação da constituição química da espécie em diferentes fases do ano, diminuindo seu potencial terapêutico (RAMOS et al., 2007; COUTINHO et al., 2010).

Um estudo feito por Pavan e colaboradores (2009) com extrato acetato de etila e metanólico dos frutos, verificou a presença de alguns flavonoides como 7 hidroxil-5-metoxil-6-C-metilflavanona, 5,7-diidroxil-6-C- metilflavanona, 5,7-diidroxil-8-C-metilflavanona, 2',4-8 diidroxil-6'- metoxilchalcona, 5,7-diidroxil-6,8-di-C-metilflavanona, 5,7-diidroxil-6,8-di-C-metilflavanona.

2.6 Óleo Essencial

Óleos essenciais são substâncias sintetizadas, armazenadas e liberadas pelas plantas. Tem se tornado via promissora de produtos naturais devido à extensa presença de compostos bioativos que lhe conferem grande potencial terapêutico e farmacológico, sendo de origem vegetal, promovem benefícios à saúde e bem-estar físico e emocional (EDRIS, 2007). Seus benefícios incluem propriedades antidepressivas, e estudos indicam efeitos neuroprotetores e anti- neuroinflamatórios (CAIXETA et al. 2023).

Os óleos essenciais são extraídos de plantas e obtidos por meio de técnicas como prensagem a frio e distintos meios de destilação. Os terpenos são compostos orgânicos voláteis presentes nos óleos essenciais, podem ser extraídos das folhas, raízes, sementes, frutos, flores e dos troncos de plantas (BAKKALI et al., 2008). Aos terpenos são atribuídos vários efeitos: Alívio de dores de cabeça e enxaquecas, redução do estresse e ansiedade, melhora da qualidade do sono, alívio de dores musculares e articulares, melhora da digestão, fortalecimento do sistema

imunológico, alívio de sintomas de TPM e menopausa, tratamento de problemas respiratórios, alívio de sintomas de depressão e ansiedade. Outros benefícios estão relacionados aos efeitos no trato gastrointestinal, como diminuição de espasmos, e agindo contra a insônia. Muitos óleos apresentam ações antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica e inseticida, o que apresenta relevância para as indústrias farmacêutica, agrícola, nutricional e cosmética (OLIVEIRA et al., 2016; SANTIAGO; GODOY, 2022).

Nesse sentido, estudos químicos das folhas de *C. adamantium*, realizado por Coutinho et al. (2008) identificaram a presença de quercetina, miricetina e rutina. Após a análise do óleo essencial desta espécie de *Campomanesia* foram obtidos oitenta e dois componentes, como limoneno (21,9%), α -pineno (13,4%) e β -pineno (9,0%), identificados no óleo da folha e trinta e sete, como ledol (20,9%), globulol (9,3%) e α -cadinol (7,5%), encontrados no óleo da flor (COUTINHO et al., 2008).

2.7 Cultura De Células

A cultura de células é amplamente utilizada na pesquisa de produtos naturais, semi-sintéticos e de síntese, permitindo avaliar de forma imediata o impacto desses compostos nas células, fornecendo respostas rápidas, essenciais na seleção destes novos fármacos anticancerígenos (STORCH et al., 2017).

Os testes de viabilidade celular são técnicas utilizadas para estimar a quantidade de células viáveis com base em vários indicadores das funções celulares, incluindo a produção de ATP, a integridade da membrana celular, a adesão das células, a oxirredução de coenzimas e a atividade na captação de nucleotídeos.

O cultivo celular *in vitro* apresenta inúmeras vantagens, o ambiente em que a célula é exposta é controlado quanto ao pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e O₂, além das condições fisiológicas que podem ser mantidas relativamente constantes. Outra vantagem é a possibilidade de realizar repetições e testar inúmeros compostos em um mesmo experimento, é mais viável economicamente que os testes *in vivo* (FRESHNEY, 2005; SUGGITT et al., 2005).

Neste estudo o método colorimétrico utilizado em células aderentes de tumores sólidos foi o da sulforrodamina B (SRB) descrito por Skehan e colaboradores (1990). A SRB é um corante solúvel em água de cor avermelhada e pode ser utilizado

para estimar a citotoxicidade de substâncias em ensaios com células aderentes. Desde a década de 1990 estudos vêm adotando como protocolo de viabilidade celular a quantificação da SRB em contato com aminoácidos residuais de células aderentes saudáveis e cancerosas. O ensaio pela SRB é relativamente rápido e pode ser feito com poucas etapas.

Estudos *in vitro* fazem parte da triagem de novos quimioterápicos, porém a atividade seletiva sobre células cancerosas observadas em modelos *in vitro* pode não se refletir necessariamente *in vivo*, pois, neste ensaio as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da droga em estudo são consideradas, ao contrário do que acontece com os ensaios *in vitro*. Portanto, o estudo combinado desses dois modelos é indicado para uma avaliação mais completa se tratando da atividade de uma nova substância com potencial anticâncer (SMITH et al., 2005).

2.8 Modelo experimental de melanoma murino *in vivo*

Os modelos experimentais são fundamentais para as descobertas de novos fármacos antineoplásicos, permitindo a avaliação de substâncias quanto ao seu potencial anticâncer. Um dos modelos mais utilizados em estudos de atividade antitumoral é o modelo experimental de melanoma murino com a linhagem B16-F10, cujo crescimento se dá tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo desenvolvido em camundongos C57/BL6 e BALB/C (JUNQUEIRA, 1997; PETTAN-BREWER et al., 2016). Estas células quando inoculadas por via subcutânea exibem potencial de difusão neoplásica sem causar desenvolvimento de metástase, à medida que, se inoculadas via endovenosa manifestam fixação em parênquima pulmonar gerando nódulos macroscópicos na superfície dos pulmões passíveis de serem contados (NAKAMURA et al., 2002; ZHAO et al., 2001).

Os modelos animais são uma aproximação da realidade. É possível o estudo enumerar vias envolvidas na instalação e progressão tumoral utilizando modelos de melanoma murino, pois retratam boa similaridade com a neoplasia humana (DE SOUSA et al., 2013). Entretanto, há uma ampla pluralidade de modelos para estudos, dentre os quais se incluem mutações gênicas, interações proteína-proteína, sensibilidade a compostos farmacológicos, imunoterapia e os processos de invasão de metástases (CULP et al., 2006; TALMADGE et al., 2007).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito anticâncer *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial extraído da folha de Guavira (**Campomanesia adamantium**).

3.2 Objetivos Específicos

- Obter o óleo essencial das folhas da guavira (*Campomanesia Adamaantium*)
- Conhecer o perfil químico do óleo obtido
- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial da folha da guavira
- Verificar a atividade anticâncer *in vitro* do óleo em linhagem tumoral de melanoma murino
- Calcular o índice de seletividade do óleo essencial de guavira
- Conhecer a toxicidade oral aguda do óleo essencial da folha da guavira
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do óleo essencial em modelo experimental de melanoma murinho em diferentes vias de administração do óleo.

4 Metodologia

4.1 Obtenção do óleo essencial das folhas da guavira (*Campomanesia Adamantium*)

Para realização deste trabalho, folhas da guavira *in natura* foram coletadas região Centro Oeste do Brasil, na Agência de Desenvolvimento Agrária e Extensão Rural (AGRAER) no Município de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, localizada a (537 m de altitude; 20° 27' S; 54° 37' W) com plantas cultivadas na área. A coleta das folhas ocorreu nos meses de abril e junho de 2023 em horários entre 04:00 às 06:00 horas da manhã. O material vegetal coletado foi transportado até a Universidade Federal do Mato Grosso do Sul– UFMS e depositado no laboratório de Biofisiofarmacologia onde foi identificado e submetido a um processo de seleção das folhas para remoção de impurezas, tais como folhas com a presença de ácaros, galhos, flores e frutos. O material foi acondicionado em sacos plásticos e vedados, eliminando a maior quantidade possível de ar para serem congeladas em freezers e mantidos conservados até o momento da sua utilização.

4.2 Método de extração do óleo essencial

Há três modalidades diferentes do método de destilação com água/vapor: Destilação utilizando água (hidrodestilação), destilação com água e vapor, e destilação por vapor (ROSTAGNO; PRADO, 2015).

Neste estudo, o método utilizado para extração de óleos essenciais foi de hidrodestilação por arraste a vapor, onde a planta aromática permanece em contato com a água fervente, podendo estar completamente imersa ou flutuando. Este processo resulta na separação de misturas utilizando o vapor de água para volatilizar substâncias presentes em uma planta. Para este processo foram pesadas amostras (200 g) das folhas *in natura*, utilizando balança de precisão, método de hidrodestilação usando um aparelho tipo Clevenger, em processo semelhante ao empregado por (VISCARDI et al., 2017). Após pesagem, as folhas foram trituradas em um liquidificador, colocado em balão volumétrico de vidro com fundo redondo com capacidade para 1000 ml e adicionado 450 ml de água destilada, deixando-a por 4 horas no aparelho tipo Clevenger acoplado a uma manta aquecedora a uma temperatura de aproximadamente 100°C (Figura 4). O sistema de refrigeração

utilizado foi por água corrente em temperatura ambiente e o óleo resultante deste processo foi acondicionado em um tubo de vidro vedado com papel alumínio, mantendo-o na geladeira. Foi usado sulfato de sódio anidro para remover vestígios de água presente no óleo essencial. As alíquotas dos óleos foram usadas no cálculo dos rendimentos da extração, usando como base o peso das folhas in natura da planta (SANTOS et al., 2004).

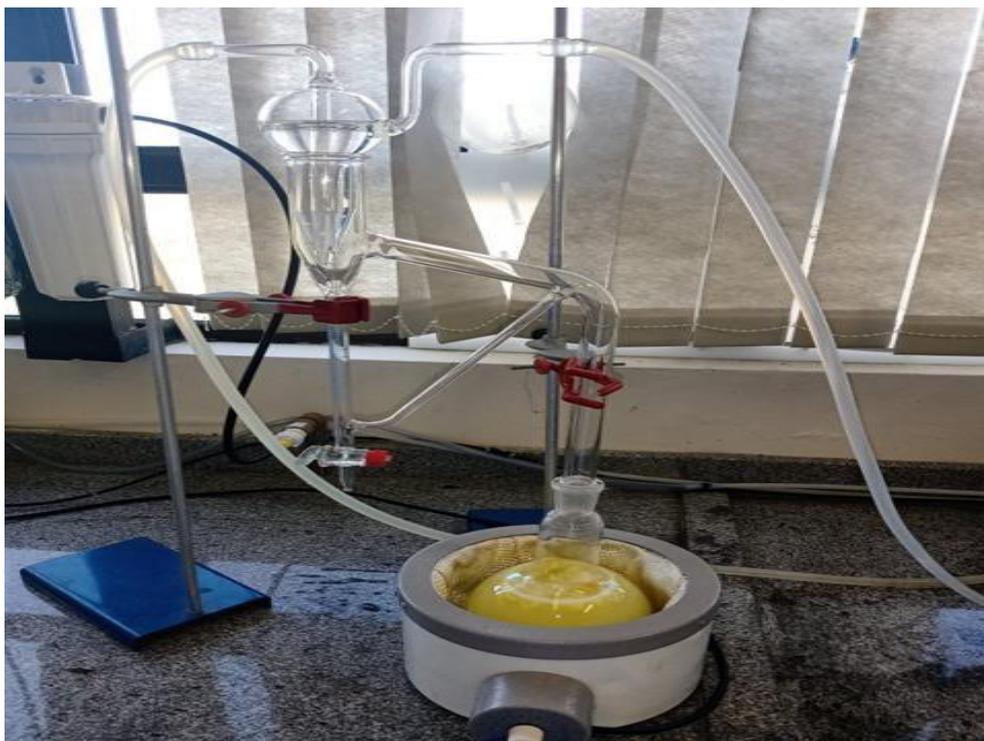


Figura 4 - Clevenger (extrator do óleo essencial)
Fonte: <https://pta.animalia-life.club/extração>

4.3 Perfil químico do óleo essencial da guavira

A análise GC/MS foi realizada usando um gás Shimadzu GC/MS QP2010 PLUS Cromatógrafo (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas operando a 70 eV, Rtx®-5MS Restek coluna capilar de sílica fundida-difenil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30 m × 0,25 mm d.i., espessura de filme de 0,25 mm e equipado com um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu). O óleo essencial foi dissolvido em diclorometano (1 mg. mL⁻¹) e uma injeção foi empregado um volume de 1 µL, com proporção de divisão de 1:50. A temperatura do injetor foi de 250°C, com o gás de arraste (hélio com pureza de 99,999%) em um

fluxo de 1 mL.min⁻¹ e pressão de 87,1 kPa. O a temperatura do forno foi programada a partir de 50°C (isotérmico por 1,5 min), com aumento de 3°C/min, a 260°C, terminando com um período isotérmico de 5 min a 260°C.

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi realizada comparando os espectros de massa obtidos com aqueles do banco de dados de equipamentos (Wiley 7 libe Nist 08 lib) e usando o Retention Índice (RI), calculado para cada constituinte como descrito anteriormente (ADAMS, 2017).

Quando a mistura de água e biomassa é aquecida até atingir o ponto de ebulição, os vapores resultantes são direcionados para o condensador, onde ocorre a troca de calor e a condensação dos mesmos com o uso de água de refrigeração, em um processo conhecido como destilação. Durante essa etapa, é possível observar no tubo separador do equipamento as fases líquidas do óleo essencial e da água, sendo que a água é recolhida de volta ao recipiente inicial por meio de um tubo de retorno, enquanto o óleo essencial, extraído das folhas, acumula no fundo do tubo por ser mais denso que a água. Esse processo se repete de forma contínua até que a operação complete um tempo aproximado de 240 minutos, momento em que o sistema é desligado. A medida do volume de óleo essencial extraído é realizada diretamente na escala volumétrica do tubo de ensaio. Em seguida, o óleo é transferido e recebe uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro para absorver eventuais partículas de água presentes. Depois, utilizando uma pipeta do tipo Pasteur, o óleo desidratado é transferido para outro tubo de 2 ml, fechado com tampa, e armazenado em local fresco, protegido da luz direta (SANTOS et al., 2004).

4.4 Ensaio de Citotoxicidade

A técnica colorimétrica empregada para este ensaio foi a sulforrodamina B (SRB), conforme detalhado por Skehan et al. (1990).

Para a realização do ensaio, foram utilizadas as linhagens: normais (fibroblastos murinos 3T3 e células endoteliais de cordão umbilical humano - HUVEC). Alcançada a densidade celular apropriada, as células foram desprendidas dos frascos de cultivo (garrafas) utilizando tripsina-EDTA (etapa inicial realizada conforme descrito anteriormente para a manutenção celular) e transferidas para um tubo cônico contendo meio completo (em quantidade três vezes maior que

a tripsina) e centrifugadas por 4 minutos a 1000 rotações por minuto. Para tanto foi adicionado 2ml de meio de cultura ao pellet, do qual uma amostra foi retirada para diluição em corante supravital (azul de tripan 1:4). Esse corante evidencia as células inviáveis, que foram incluídas na contagem. Para determinar a densidade celular necessária, foi utilizado um contador manual (Câmara de Neubauer). Após a contagem das células, foi feito o preparo das placas T0 (Tempo Zero) e de teste. Na placa T0, suspensões celulares de cada linhagem foram adicionadas em triplicata, (triplicata do meio de cultura). A T0 foi então incubada e, após 24 horas, foi realizado o procedimento de coloração (descrito abaixo) com a adição de sulforrodamina B (SRB), um corante que se liga às proteínas das células (SKEHAN et al., 1990). A placa T0 serve como referência para o início do experimento, permite medir a densidade de células viáveis no momento em que as amostras foram adicionadas à placa de teste. Na placa de teste, também foram adicionadas as suspensões celulares e, após a incubação inicial de 24 horas, as amostras de teste foram adicionadas em triplicata, nas concentrações de 0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL, com a placa sendo novamente incubada por 48 horas. A placa teste continha ainda, o branco de cada concentração da amostra-teste, o controle negativo (células mais 100 µL de meio) e o controle positivo da doxorubicina (0,025 - 0,25 - 2,5 e 25 µg/mL).

Após a incubação de 48 horas, procedeu-se à coloração com SRB. O procedimento de coloração foi realizado da seguinte forma: O sobrenadante das cavidades foi retirado, deixando apenas as células nelas contidas. Foram colocados 100µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% em cada cavidade. As placas foram mantidas em repouso por 30 minutos a 4 °C, protegidas da luz. Em seguida, o sobrenadante foi removido e as placas foram lavadas em água corrente e depois de secas, 50µL de SRB (Sigma, EUA) diluído a 0,1% em ácido acético a 1% foi adicionado às placas. Novamente, as placas mantiveram-se em inércia por 30 minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, as placas são lavadas 5 vezes com ácido acético a 1% para retirar o excesso de corante, 100 µL de tampão Trizma Base (10 mM, Ph 10,5) (Sigma, EUA) são inseridos à placa seca para solubilizar o corante ligado às proteínas celulares imobilizados (Figura 5).

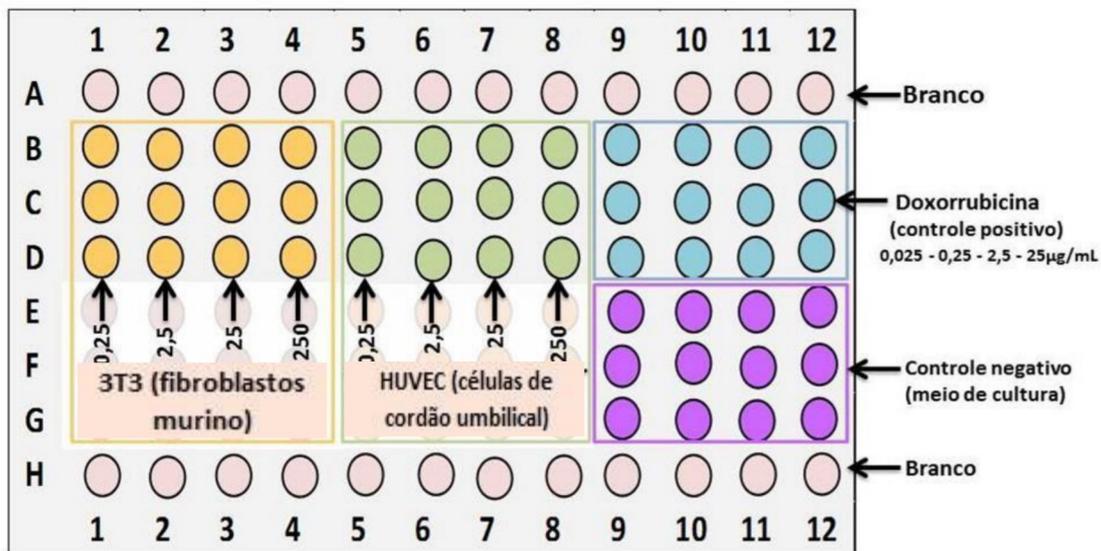


Figura 5 - Representação da placa de 96 poços após adição das amostras-teste e Doxorubicina (controle positivo)

Fonte: Acervo pessoal

4.5 Atividade anticâncer in vitro do óleo

Foi utilizada a linhagem celular neoplásica B16-F10 (ATCC CRL-6322, melanoma murino). A técnica colorimétrica empregada neste ensaio foi a sulforrodamina B (SRB) e descrito no item 4.4 (SKEHAN et al., 1990).

A densidade óptica resultante foi lida em um leitor de placas a 540 nm. os valores de IC50 (a concentração que inibe 50% do crescimento) foram calculados a partir da diferença nas concentrações entre o controle negativo (sem tratamento) e os tratados com o óleo essencial.

4.6 Cálculo do índice de seletividade do óleo essencial de guavira

O Índice de seletividade foi calculado após ensaio com linhagem neoplásica, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos. Assim, o IS corresponde à divisão entre o valor da GI50 de cada composto teste na linhagem de células normais NIH/3T3 e o valor da GI50 de cada composto na linhagem de células neoplásicas ($IS = GI50_{3T3} / GI50_{células\ neoplásicas}$). Valores de IS igual ou superior a 2,0 eram considerados significativos segundo Suffness e Pezzuto (1991), enquanto que, mais recentemente, Indrayanto, Putra e Suhud (2021) definiram IS maior que 10.

4.7 Toxicidade oral aguda

O teste de toxicidade aguda do óleo essencial da folha da guavira, foi realizado após aprovação pelo CEUA – UFMS, sob protocolo número 1.292/2023. Foi realizado em camundongos BALBC machos e fêmeas com média de peso de 28g. Os mesmos permaneceram por um período de adaptação de 3 dias sob condições ambientais controladas, sendo a temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas, com ração padrão (NUVITAL® CR1) e água à vontade.

A toxicidade aguda do óleo essencial da folha da guavira foi baseada na OECD (2001). Para o teste de toxicidade aguda do óleo, foram utilizados 15 animais divididos em 5 grupos iguais formados por três animais machos e três fêmeas, sendo um grupo controle com fêmeas (GFC) e outro com machos (GMC), que receberam veículo (azeite) via oral (gavagem) e 4 grupos tratados com diferentes concentrações do óleo essencial da folha da guavira, GFT (fêmeas) e GMT (machos), com doses de 2000 mg/kg, 300 mg/kg, 50 mg/kg e 5 mg/kg de peso corporal, diluído em azeite de oliva administrado via oral (gavagem) em dose única. A dose inicial testada foi de 50 mg/kg, não ocorrendo mortes de animais nas primeiras 24 horas de exposição dos animais a esta, foram testadas também as doses 2000 mg/kg, 300 mg/kg (Luiz et al., 2019). Após o tratamento, os animais foram observados nos primeiros 30 minutos, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 12h, 24h, e periodicamente durante 14 dias (VALADARES, 2006). Neste período foram observados possíveis sintomas de toxicidade como: alterações cutâneas, pelos (piloereção), mucosas, olhos, padrão circulatório e respiratório, locomoção anormal, reação a estímulos, diarreia, salivação, tremor, ptose, alterações dos tônus muscular, hipnose, convulsão e contorção (GOMES et al., 2013). O peso corporal dos animais foi verificado no dia da administração dos compostos e no décimo quarto dia pós-administração, ainda no décimo quarto dia os animais foram submetidos a eutanásia mediante sedação por xilazina (10 mg/Kg) e cetamina (100 mg/Kg) para coleta dos órgãos (fígado e rins) para observação macroscópica e pesagem.

4.8 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do óleo essencial em modelo experimental de melanoma murinho

Para a realização destes ensaios *in vivo*, o projeto foi submetido à Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), conforme determinação do CONCEA. O projeto foi aprovado sob o protocolo número 1.292/2023. O local para a realização dos experimentos foi LMED – Laboratório de bioensaios da Faculdade de medicina da UFMS (FAMED).

4.8.1 Desenvolvimento do melanoma experimental murino *in vivo*

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 25-30g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (dimensão 40 x 35 x 17 cm), na quantidade de 5 animais / gaiola, à temperatura de aproximadamente 25°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL® CR1) e água à vontade. Os mesmos foram aclimatados às condições do laboratório durante 3 dias antes de serem submetidos ao experimento.

Para o desenvolvimento do nódulo hipodérmico, suspensões de células B16 F10 (5 x 10⁵ /0,2mL PBS) foram inoculadas subcutaneamente na região interescapular dos animais. No 10º dia após a inoculação os animais foram distribuídos em grupos e tratados conforme descrito a seguir:

- Grupo 1 (Controle, apenas células B16F10)
- Grupo 2 (Tratado com óleo essencial de guavira via Gavagem 200mg/kg)
- Grupo 3 (Tratado com óleo essencial de guavira via Gavagem 300mg/kg)
- Grupo 4 (Tratado com óleo essencial de guavira via I.P 200ug/ml)
- Grupo 5 (Tratado com óleo essencial de guavira via I.P 300ug/ml)
- Grupo 6 (Tratado via I.P com Doxorrubicina 5mg/kg)
- Grupo 7 (Tratado com óleo essencial de guavira via (I.P 45mg/ml)
- Grupo 8 (Tratado com óleo essencial de guavira 3%, via tópica)

O método de tratamento utilizado para os grupos que receberam o composto via oral (gavagem) e I.P. (intraperitoneal) foi de uma aplicação única, enquanto o grupo de tratamento tópico com o óleo essencial, recebeu o composto uma vez ao dia sempre o mesmo horário por um período de 10 dias. A dose utilizada em cada

camundongo foi determinada com base nos cálculos obtidos em relação a área do tumor, variando de animal para animal. Para maior precisão na dose do óleo, utilizou-se para a aplicação um pipetador com ponteira. No 21º dia após a inoculação das células (11º dia após o tratamento), os animais foram submetidos à eutanásia. Os nódulos da região dorsal foram retirados para avaliação dos seguintes parâmetros: peso (g) e volume (mm³). Para a determinação da massa tumoral os nódulos foram pesados em balança analítica RADWAG®. Os diâmetros foram medidos utilizando-se paquímetro analógico e o volume obtido por meio da fórmula de Steel ($D \times d^2 / 2$), onde D e d dão os diâmetros maiores e menores, respectivamente (NETO et al., 2002). A partir daí, foi realizado o cálculo para definição da taxa de inibição de crescimento tumoral. Os animais foram pesados no dia 0 (dia da inoculação das células B16-F10), no 10º dia (início do tratamento) e 21º dia (eutanásia).

4.9 Análise de Dados

A porcentagem de crescimento celular, conforme indicado por Monks et al. (1991), foi empregada na criação de gráficos por regressão não linear para obtenção da GI50 utilizando o software de análise de dados Origin 6.0.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média comparados com os controles por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade com auxílio do software 8.0.

Na toxicidade oral aguda, aos dados obtidos aplicaram-se os testes de análise de variância (ANOVA) seguido de teste Tukey e teste T (Graph Pad Prism 5®). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do óleo essencial das folhas da guavira (*Campomanesia Adamantium*)

O gênero *Campomanesia* (Myrtaceae) compreende espécies de interesse econômico e científico. Produzem óleos essenciais (OE), extraídos a partir das folhas, frutos, sementes, raízes e casca. A Figura 6 representa o óleo essencial obtido das folhas da guavira pelo método de hidrodestilação.

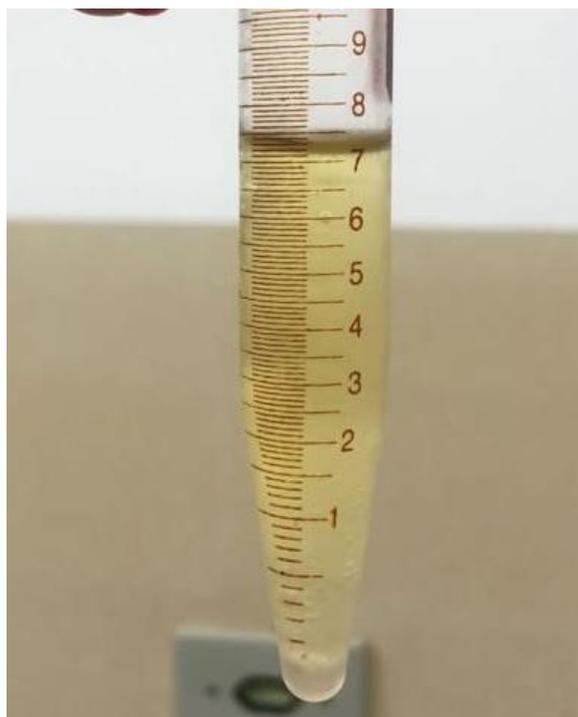


Figura 6 – Óleo essencial de Guavira obtido por hidrodestilação
Fonte: Acervo pessoal

Para obtenção de 7ml do óleo da folha da guavira, foram necessários 30 kg de folhas in natura. O rendimento foi calculado em função do volume de óleo em ml, dividido pela massa em grama de material utilizado multiplicado por 100 (SANTOS et al., 2004).

Em nosso estudo, o rendimento da extração do óleo essencial por hidrodestilação foi de 0,023%. Para Coutinho et al, 2008, o rendimento de óleo obtido a partir das folhas e flores frescas foi de 0,16% e 0,05%, respectivamente.

Estudos realizados com a casca do fruto da guavira mostram diferentes variações em relação ao percentual do óleo extraído, quando comparados ao rendimento do óleo da folha da guavira. Segundo Viscardi et al. (2017), os óleos essenciais obtidos da casca da guavira apresentou um rendimento de 0,32% e o da semente, de 0,98%.

Algumas desvantagens são evidenciadas neste método de obtenção do óleo essencial, como a alta temperatura e o tempo prolongado de extração, levando à deterioração de compostos insaturados e termolábeis, perda de substâncias voláteis, baixo rendimento, extração deficiente, hidrólise de elementos suscetíveis a água e a necessidade de tratamento pós-extração para remoção de água. Mesmo com estas ressalvas, trata-se de um método simples, de fácil realização, custo reduzido e com

potencial de rendimento consideravelmente elevado de óleo essencial (DANH et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012; HERZI et al., 2013).

5.2 Perfil químico do óleo essencial da guavira

Muitas plantas da família Myrtaceae são ricas em OEs (NASCIMENTO et al., 2018; ALVES et al., 2020; JESUS et al., 2020; SANTANA et al., 2020). Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos voláteis dos frutos, enquanto os sesquiterpenos são compostos majoritários nas partes restantes das plantas. Ambos apresentam potencial atividade biológica (SILVA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2019; SANTANA et al., 2020).

Os óleos essenciais podem apresentar uma variedade de atividades biológicas, incluindo antifúngica, anti-inflamatória, analgésica, antiproliferativo e antioxidante (ALVES et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2018; GARCIA et al., 2020; MENEZES FILHO et al., 2020; SÁ et al., 2018; VISCARDI et al., 2017ab).

As folhas in natura da guavira foram coletadas na estação da AGRAER do município de Campo Grande -MS. O OE foi extraído de folhas in natura uma vez que a secagem natural e artificial da biomassa foliar leva a alteração na composição química de monoterpenos e sesquiterpenos do óleo essencial (MACHADO et al., 2013).

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação utilizando um aparelho Clevenger por um período de 4 horas, seguido de análises qualitativas e quantitativas através de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Tabela 2 - Substâncias identificadas no óleo essencial das folhas de guavira (*Campomanesia* sp)

Pico	*t _r (min)	Nome do composto	Fórmula molecular	Massa Molecular	Área do Pico (%)
1	5,528	<i>β</i> -pineno	C ₁₀ H ₁₆	136	0,58
2	6,671	<i>p</i> -cimeno	C ₁₀ H ₁₄	134	0,34
3	6,777	limoneno	C ₁₀ H ₁₆	136	5,39
4	6,848	eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1,59
5	8,753	linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	7,01
6	9,200	fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0,89
7	10,821	1-borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1,67
8	11,181	4-tepineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0,62
9	11,605	<i>α</i> -tepineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	4,70
10	16,285	bicicloelemeno	C ₁₅ H ₂₄	204	1,00
11	17,522	<i>α</i> -copaeno	C ₁₅ H ₂₄	204	0,85
12	18,028	<i>β</i> -elemeno	C ₁₅ H ₂₄	204	1,27
13	18,900	<i>E</i> -cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	204	6,38
14	19,496	aromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	204	1,56
15	19,940	<i>α</i> -humuleno	C ₁₅ H ₂₄	204	2,06
16	20,170	desconhecido	C ₁₅ H ₂₄	204	1,43
17	20,647	desconhecido	C ₁₅ H ₂₄	204	0,83
18	20,789	germacreno D	C ₁₅ H ₂₄	204	7,14
19	21,283	biciclogermacreno	C ₁₅ H ₂₄	204	16,86
20	21,774	<i>γ</i> -cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204	0,65
21	22,047	<i>δ</i> -cadineno	C ₁₅ H ₂₄	204	2,19
22	23,045	germacreno B	C ₁₅ H ₂₄	204	0,84
23	23,346	veridiflorol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0,86
24	23,658	espatulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	3,66
25	23,840	desconhecido	C ₁₅ H ₂₆ O	222	5,64
26	24,067	desconhecido	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2,77
27	24,356	rosifoliol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1,39
28	24,567	epóxido de humuleno II	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0,85
29	24,944	desconhecido	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1,19
30	25,379	desconhecido	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1,16
31	25,476	<i>α</i> -cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	1,56
32	25,832	cadin-4-en-10-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	2,35

*t_r = tempo de retenção

A Figura 7, representa o perfil cromatográfico do óleo essencial extraído de folhas da guavira, in natura.

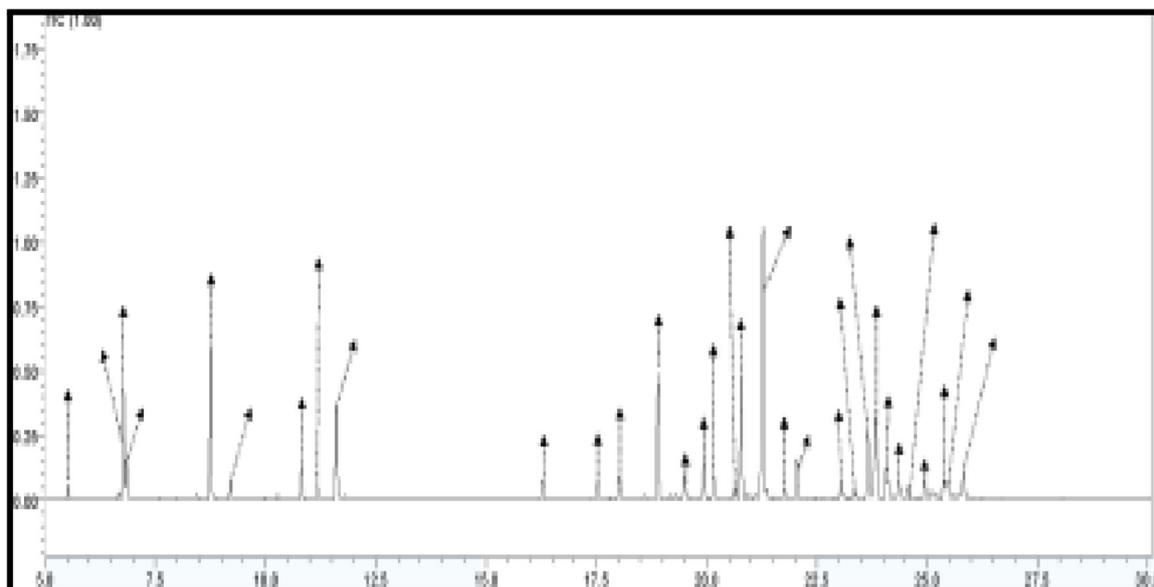


Figura 7 - Perfil cromatográfico do óleo essencial das folhas de guavira

Foram identificadas 32 substâncias, das quais muitas se destacam em maior quantidade, como o biciclogermacreno com 16.86%, linalool 7,01%, germacreno D 7,14%, *E*-cariofileno 6.38% limoneno 5.39%, α -terpineol 4.70%. Neste contexto vale ressaltar que muitos destes compostos foram identificadas também em outros tipos de plantas, tais como: Cróton sondaríamos, limão, gengibre, *Cardiopetalum calophyllum*, cravo da índia, frutas cítricas, eucalipto.

Os monoterpenos α -pineno, β -pineno, *o*-cimeno e D-limoneno presentes no óleo essencial das folhas de *Campomanesia adamantium* também foram identificados no óleo essencial dos frutos da mesma espécie por Oliveira, J. D. D. (2015). Estudos apontam que o β pineno, juntamente com o α -pineno e outros terpenos, possuem propriedades citotóxicas, lipofílicas, bactericidas, fungicidas, inseticidas, anticarcinogênicas, pesticidas, antioxidantes e sedativas (Mercier et al., 2009). Os óleos essenciais contendo terpenos, terpenóides, fenilpropenos apresentam atividades antimicrobianas (HYLDGAARD et al., 2012).

Entre os componentes encontrados no óleo essencial das folhas de guavira, aparece com destaque o sesquiterpeno espatulenol. Este composto não só contribui para o aroma de diversos óleos utilizados na indústria de perfumes, como também apresenta propriedades antibacterianas e atividade citotóxica moderada em células do tipo KB (SANTOS et al., 2012; LIMBERGER et al., 2004).

Resultados um pouco diferentes foram encontrados por Coutinho et al., 2009, que encontrou limoneno (21,9%), α -pineno (13,4%) e β -pineno (9,0%). Essas diferenças podem estar associadas ao fato de que a coleta ocorreu durante as fases de floração, frutificação. Na floração as substâncias majoritárias foram monoterpenos (limoneno, α -pineno e β -pineno) e durante o estágio vegetativo as substâncias majoritárias foram sesquiterpenos (biciclogermacreno e globulol). A produção e os diferentes tipos de terpenos podem ser influenciados por fatores ambientais, como variações na luz, temperatura e umidade (LIMA et al., 2003). No período de floração, a planta enfrentou chuvas e temperaturas elevadas na primavera, enquanto na fase vegetativa, ela passou por condições de seca e temperaturas mais baixas no outono. Durante os estágios de frutificação, a distribuição relativa dos compostos é claramente equilibrada entre monoterpenos e sesquiterpenos, caracterizada por altas temperaturas e menor quantidade de chuva no verão. A variação química também pode estar associada a uma adaptação da polinização por diferentes espécies de insetos, em função da estratégia reprodutiva da planta (STEFANELLO et al., 2006). Além dos fatores acima mencionados que contribuem para as diferenças na composição química dos óleos essenciais, as diferentes altitudes e tipos de solo entre nossas áreas de coleta de amostras também podem ser um fator relevante neste contexto o que pode explicar a diferença em relação ao estudo de estamos desenvolvendo, pois neste caso a coleta foi realizada no mês de abril, período estes pós colheita onde já não encontra-se flores e frutos, enquanto que no nosso estudo a coleta foi realizada em um único local, e em um período de menor umidade fator este que pode contribuir diretamente para a diferença no percentual do óleo, uma vez que estes compostos são voláteis conforme descrito na metodologia.

5.3 Citotoxicidade

A Tabela 3 apresenta os valores das concentrações que inibem 50% do crescimento das células (GI50) expressos em $\mu\text{g/ml}$, o que revela a seletividade de um composto em células neoplásicas em comparação às normais, evidenciando o potencial desse composto para aplicações em testes clínicos. Neste estudo, consideramos como ativos os valores de GI50 inferiores a $250 \mu\text{g/ml}$ e como inativos aqueles superiores a $250 \mu\text{g/ml}$.

Para a determinação da Citotoxicidade do óleo essencial da *C. Adamantium* foram utilizadas as linhagens 3T3 (fibroblasto murino) (ATCC CRL-1658) e HUVEC (células endoteliais de cordão umbilical) (ATCC CRL1730). Utilizou-se o ensaio de citotoxicidade com a sulforrodamina B (SRB).

Após a leitura da placa em leitor de Elisa, foi determinada a GI50 determinada utilizando o *software* Origin 6.0. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anticâncer considera potente atividade antineoplásica valores $GI50 \leq 4,0 \mu\text{g/mL}$. No presente estudo, os compostos foram considerados inativos quando $GI50 > 250\mu\text{g/mL}$.

Como controle positivo utilizamos a doxorrubicina que causa inibição do crescimento celular mesmo em linhagens normais. O óleo da guavira foi testado em quatro concentrações diferentes: 0.25 $\mu\text{g/ml}$ / 2.5 $\mu\text{g/ml}$ / 25 $\mu\text{g/ml}$ e 250 $\mu\text{g/ml}$. A determinação da atividade citotóxica mostrou-se eficaz na triagem para descoberta de novos agentes antitumorais (Cragg; Newman, 2005).

Tabela 3 - Valores encontrados de GI50* ($\mu\text{g/mL}$) para doxorrubicina (controle positivo) e óleo de guavira em linhagens de células normais

LINHAGENS NORMAIS	GI50 ÓLEO DE GUAVIRA	GI50 DOXORRUBICINA
3T3 (fibroblastos murino)	> 250 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$
HUVEC (células de cordão umbilical)	> 250 $\mu\text{g/ml}$	0,023 $\mu\text{g/ml}$

* Concentração que inibe 50% do crescimento celular foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando Programa ORIGIN 6,0.

O óleo não apresentou atividade citotóxica em células de fibroblastos murino e em células endoteliais do cordão umbilical ($GI50 = 250\mu\text{g/ml}$), para complementar os resultados encontrados, foram realizados estudos de toxicidade oral aguda de forma a contribuir com o potencial terapêutico deste óleo.

5.4 Atividade anticâncer in vitro do óleo

Foi utilizada a linhagem celular neoplásica B16-F10 (ATCC CRL-6322, melanoma murino). Os valores de GI50 (a concentração que inibe 50% do crescimento) para óleo das folhas de guavira e para a doxorrubicina estão apresentados abaixo (Tabela 4):

Tabela 4 - Valores encontrados de GI50* para a doxorubicina (controle positivo) e o óleo de guavira em linhagem B16F10.

LINHAGEM Neoplásica	GI50 ÓLEO DE GUAVIRA	GI50 DOXORRUBICINA
B16F10	2.85 µg/ml	0.025 µg/ml

* Concentração que inibe 50% do crescimento celular foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando Programa ORIGIN 6,0.

Ensaio biológico fornece evidências que os óleos essenciais da família Myrtaceae têm atividades contra o câncer (ALVES et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2021).

Estudos comprovam que o mirtenal e o mirtenol, extraídos das folhas de *C. guaviroba*, apresentam citotoxicidade ($IC_{50} = 19,31 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) com diversas linhagens de células de leucemia humana (Pascoal et al., 2011). Espatulenol, germacreno-B, β -cariofileno, β -óxido de cariofileno, β -mirceno e α -pineno (apenas os dois últimos não são sesquiterpenos) das folhas de *C. adamantium* tinham efeitos antiproliferativos contra células tumorais humanas (GM07492A, fibroblastos pulmonares) (Alves et al., 2020). O espatulenol, tipicamente um constituinte dominante dos OE nas folhas de *C. adamantium* (Oliveira et al., 2016) foi eficaz contra uma linhagem celular MCF-7 (carcinoma de mama) (NASCIMENTO et al., 2018).

A atividade antiproliferativa do óleo essencial das folhas de *C. adamantium* foi avaliada em diferentes linhagens de células tumorais humanas: adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma cervical (HeLa) e glioblastoma (M059J), além de, uma linhagem celular humana normal (GM07492A, fibroblastos pulmonares). O óleo essencial exibiu menores valores de CI_{50} (77 a 80) em todas as linhagens celulares tumorais avaliadas, sendo menores que aquele obtido na linhagem celular normal $IC_{50} = 369.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ (ALVES et al., 2020).

5.5 Cálculo do índice de seletividade do óleo essencial de guavira

O Índice de seletividade foi calculado após ensaio com linhagem neoplásica, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos. Assim, o IS corresponde à divisão entre o valor da GI50 de cada composto teste na linhagem de células normais NIH/3T3 e HUVEC (células de cordão umbilical) e a GI50 obtida em B16F10. O IS obtido foi de 87.71 para ambas as linhagens normais (murino e

humana). Valores de IS maiores que 10 indicam seletividade da amostra para linhagem neoplásica (INDRAYANTO et al., 2021).

No estudo realizado por Alves et al., 2020, o índice de seletividade foi calculado por meio da razão entre o valor IC50 do óleo essencial obtidos para células GM07492A (fibroblastos pulmonares) e os valores encontrados para as linhagens celulares tumorais testadas variou de 4.6 a 4.8, valor menor que o apresentado em nosso estudo na linhagem B16F10 testada.

5.6 Avaliação da toxicidade do óleo da guavira

O referido ensaio foi realizado com 13 camundongos da linhagem BALB/C, todos machos, pesando em média 28 g. oriundos do Biotério Central do Instituto de Biociências (INBIO/UFMS). Foram mantidos 3 animais por gaiola (dimensão 40 x 35 x 17 cm), com ciclo de claro/escuro de 12 horas, em temperatura controlada de aproximadamente 23°C, com ração e água à vontade.

A troca de maravalha ocorreu 3 vezes por semana, a reposição de água e ração obedeceu ao mesmo critério, por um período total de 24 dias, sendo destes, 17 dias do experimento e 7 dias de adaptação dos camundongos.

Após 3 dias de adaptação, os animais foram separados em 5 grupos, sendo 4 grupos com (n=3) e um (n=1) que foi o grupo controle. Para o ensaio, foram realizadas diluições do óleo da folha de Guavira, em azeite de oliva, nas concentrações de 2000mg/kg, 300 mg/kg, 50mg/kg e 5 mg/kg, cada concentração para um grupo (dose de 200µl), totalizando os 12 camundongos do ensaio, acrescido de 1 animal como controle (não recebeu substância). Os animais foram observados e avaliados por um período de 17 dias, até a eutanásia e coleta de órgãos.

Após a aplicação da dose mais alta de 2000mg/kg, um animal veio a óbito, restando 12 camundongos, sendo 2 na caixa de 2000mg/kg, 3 na caixa de 300mg/kg, 3 na caixa de 50mg/kg, 3 na caixa de 5mg/kg e 1 na caixa de controle.

Os parâmetros avaliados após a administração foram: Anestesia, atividade, força, resposta ao toque, tremores, locomoção, frêmito vocal, irritabilidade, contorção, ptose, lacrimação, respiração, ataxia, alimentação e água. A avaliação foi realizada após o prazo de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24

horas, 3 dias, 6 dias, 7 dias, 10 dias, 12 dias, 17 dias. No último dia, foi realizado novamente o peso médio, sendo o mesmo de 27,9g e 30 g. para o controle.

Os parâmetros avaliados encontram-se descritos nas tabelas abaixo considerando as diferentes concentrações do óleo administradas via gavagem.

Quadro 1 - Avaliação do grupo (C) e tratado (T) com 2000mg/kg em relação ao tempo em horas (H) e dias (D)

Parâmetro	Grupo 1 2000mg/kg	0,5h	1h	2h	4h	6h	12h	24h	3d	6d	7d	10d	17d
Anestesia	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atividade	C	4	3	3	1	2	3	2	3	3	4	3	3
	T	1	0	1	1	2	1	1	2	3	4	3	3
Força para agarrar	C	3	3	4	3	3	4	3	2	3	4	2	4
	T	3	2	3	1	3	3	4	3	3	3	4	4
Resposta ao toque	C	4	4	1	1	1	1	2	1	3	2	1	3
	T	2	1	2	2	1	2	2	2	3	3	3	3
Tremores	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	3	1	1	0	1	2	0	2	0	0	0	0
Locomoção	C	4	4	3	3	3	3	2	3	3	4	3	3
	T	0	1	2	2	1	2	1	2	3	4	3	3
Frêmito vocal	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	C	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	2
	T	2	0	2	0	0	1	0	2	0	0	1	2
Contorção	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Ptose	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	3	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração	C	2	3	2	3	3	3	3	3	3	4	3	3
	T	3	2	3	2	4	3	3	4	3	3	3	3
Ataxia	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	1	1	1	1	2	2	2	2	0	0	0	0
Alimentação com água	C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	T	0	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3
Alimentação com comida	C	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	T	0	3	1	2	1	2	3	1	3	3	3	3

Quadro 2 - Avaliação do grupo (C) e tratado (T) com 300mg/kg em relação ao tempo em horas (H) e dias (D)

Parâmetro	Grupo 2 <u>300mg/kg</u>	0,5h	1h	2h	4h	6h	12h	24h	3d	6d	7d	10d	17d
Anestesia	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atividade	C	4	3	3	1	2	3	2	3	3	4	3	3
	T	1	1	4	1	2	1	2	3	3	4	3	3
Força para agarrar	C	3	3	4	3	4	4	3	2	3	4	2	4
	T	3	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4
Resposta ao toque	C	4	4	1	4	1	1	3	1	3	2	1	3
	T	2	4	4	1	2	4	2	1	3	3	2	3
Tremores	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
Locomoção	C	4	4	3	3	3	3	2	3	3	4	3	3
	T	2	2	4	3	3	3	3	3	3	4	3	3
Frêmito vocal	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	C	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	2
	T	1	0	2	2	2	3	1	2	1	0	0	1
Contorção	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Ptose	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	2	1	2	2	3	1	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração	C	2	3	2	3	3	3	3	3	3	4	3	3
	T	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Ataxia	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Alimentação com água	C	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	T	1	2	3	2	2	2	3	2	3	3	3	3
Alimentação com comida	C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	T	1	2	3	2	2	2	3	2	3	3	3	3

Na observação dos camundongos percebeu-se que na dose mais elevada de 2000mg/kg entre as primeiras horas até o 3º dia, apresentou sinais de intoxicação bem evidentes, como falta de locomoção, interação, pouca resposta a estímulos como toque e força para agarrar, eriçamento de pelos, ptose persistente e perda de apetite, sede e óbito. Após o 3º dia, houve regressão dos sintomas, porém houve um desenvolvimento de uma ascite não muito evidente em apenas um camundongo, que persistiu até o dia da eutanásia, mas não limitou a evolução do camundongo e não foi evidenciado danos durante a análise macroscópica dos órgãos.

Em relação aos camundongos que receberam a dose de 300mg/kg, houve sinais de uma intoxicação moderada que não atingiu a todos e a presença de sintomas como eriçamento de pelo, ptose persistente, ataxia leve, média resposta ao estímulo do toque e diminuição da hidratação e alimentação, indica necessidade de rever esta dose, mesmo diante do exposto, com regressão gradual dos sintomas ao decorrer dos dias, todos permaneceram vivos até o dia da eutanásia.

Com o grupo de camundongos que receberam a dose de 50mg/kg e 5mg/kg não houve diferença substancial de comportamento e pouco sinais de toxicidade, sendo o mais evidente uma hiperatividade incomum que resultou em uma maior irritabilidade, porém estes sintomas não reduziram suas funções vitais, e os camundongos seguiram bem até o dia da eutanásia.

Estudos conduzidos por Viscardi et al. 2017 avaliaram a toxicidade do óleo essencial da casca e semente de frutos de *C. adamantium* em modelo animal. Os animais foram tratados com doses de 100 and 300 mg/kg e não apresentaram sinais clínicos de toxicidade nos animais. Foi observado diminuição significativa ($P < 0,01$) na migração de leucócitos na dose de 300 mg/kg. Embora estes resultados não expressam dados do óleo essencial das folhas, corroboram com a baixa toxicidade encontrada neste estudo na concentração de 300mg/kg.

5.7 Avaliação da atividade antitumoral em melanoma murino

Os resultados obtidos evidenciam uma diminuição do peso e volume dos nódulos dos animais tratados com o óleo essencial das folhas da guavira nas diferentes concentrações e vias de administração do óleo nos camundongos inoculados com células B16F10.

Foram verificadas diferenças estatísticas significativas dos pesos entre o grupo Controle (Somente células) e os demais grupos ($p \leq 0.01$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores referentes ao peso e volume tumoral dos nódulos obtidos dos grupos tratados com óleo essencial de guavira

GRUPOS TRATADOS	PESO (mg)	VOLUME (cm ³)
Grupo 1 (Controle - apenas células B16) (n = 6)	738,2 ± 275,8	0,9506 ± 0,3801
Grupo 2 (Gavagem 200mg/kg) (n = 9)	228,03 ± 98,84*	0,7167 ± 0,4319
Grupo 3 (Gavagem 300mg/kg) (n = 9)	91,81 ± 14,13*	0,1158 ± 0,0373
Grupo 4 (I.P 200ug/ml) (n = 9)	156,8 ± 36,46*	0,0991 ± 0,0327
Grupo 5 (I.P 300ug/ml) (n = 9)	168,2 ± 57,73*	0,1425 ± 0,0377
Grupo 6 (I.P) Doxo 5mg/kg) n = 6)	195,13 ± 98,47*	0,1350 ± 0,0788
Grupo 7 (I.P 45mg/ml) (n = 6)	159,0 ± 22,50*	0,0200 ± 0,0075
Grupo 8 (óleo de guavira a 3%) (n = 6)	89,08 ± 23,35*	0,1110 ± 0,0254

Resultados expressos como média ± EPM.

* = diferença significativa entre controle e grupo tratado (ANOVA, seguida de teste de Tukey, $p \leq 0.01$)

A tabela 5 mostra que as maiores reduções nos pesos dos tumores foram nos grupos G3 e G8, com um percentual de inibição do crescimento celular de 87,56% e 87,93% respectivamente), indicando que o óleo de guavira 300mg/kg administrada via gavagem foi tão efetivo quanto o óleo de guavira 3%, via tópica. Os grupos tratados com Doxorubicina intraperitoneal 5mg/kg e óleo de guavira 200mg/kg, via gavagem foram os grupos com menor redução nos pesos dos nódulos com (73,56% e 69,10%).

Referente aos volumes dos grupos tratados, embora não apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle, observou-se que a maior inibição nos volumes dos nódulos foi no Grupo 7 (óleo de guavira I.P 45mg/ml), com 97,89%.

Enquanto o Grupo 2 (óleo de guavira (Gavagem 200mg/kg) foi o grupo que apresentou a menor redução no volume tumoral, de 25,09%. Para os demais grupos a redução dos volumes variou de 85,01 a 88,32%.

Para uma melhor visualização dos resultados a Figura 8 demonstra os valores dos pesos e nódulos obtidos após tratamento com óleo de guavira.

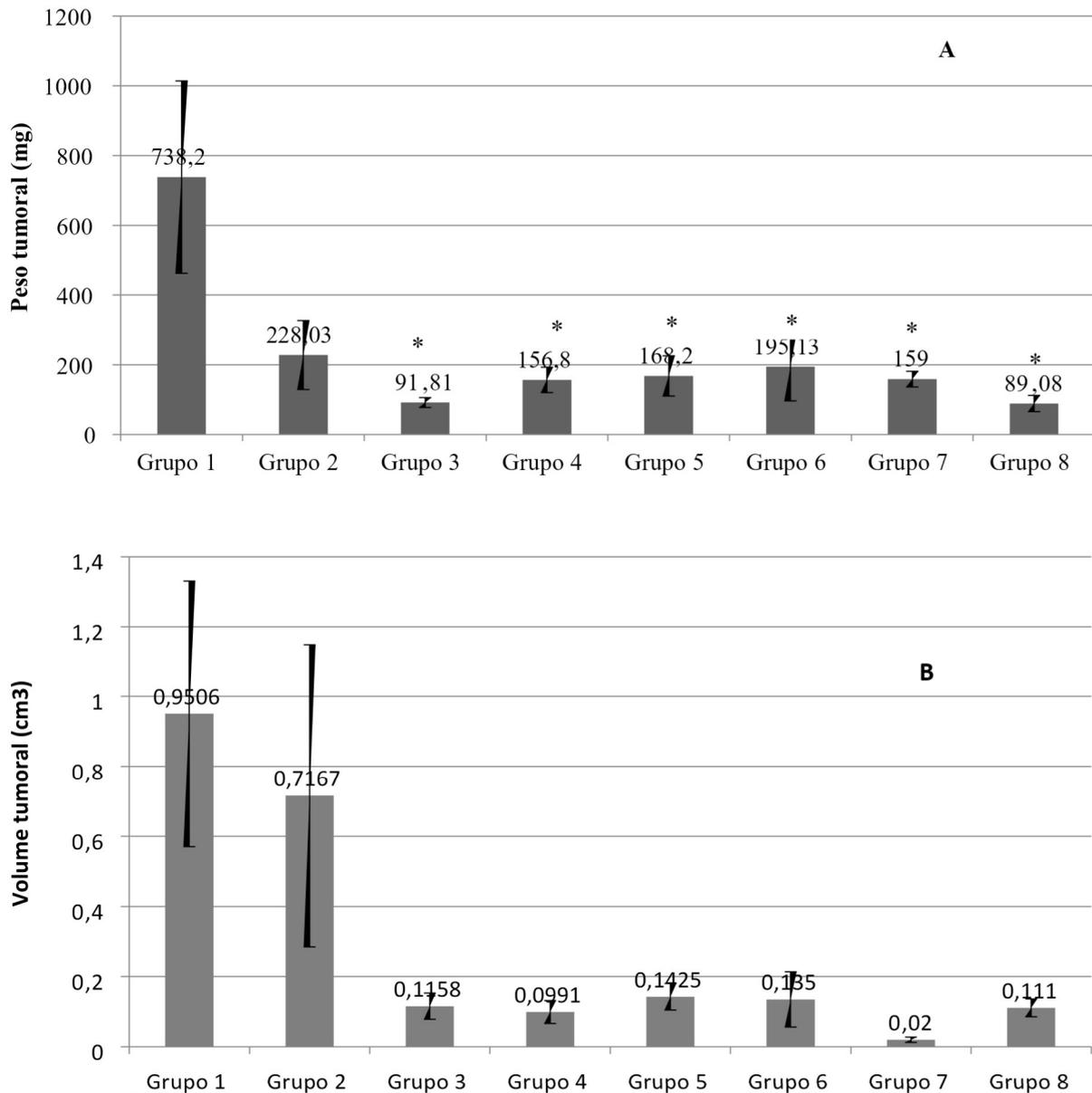


Figura 8 - Efeito antitumoral dos tratamentos em modelo experimental murino. Resultados em relação ao peso (A) e volume (B) dos nódulos após os tratamentos. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $p \leq 0.05$ (ANOVA seguido de pós teste de Tukey). Grupo 1 (Grupo Controle, células B16F10). Grupo 2 (Óleo essencial de guavira, via gavagem, 200mg/kg). Grupo 3 (Óleo essencial de guavira, via gavagem, 300mg/kg). Grupo 4 (Óleo essencial de guavira, via intraperitoneal, 200ug/ml). Grupo 5 (Óleo essencial de guavira, via intraperitoneal, 300ug/ml). Grupo 6 (Óleo essencial de guavira, via intraperitoneal, Doxorrubicina 5mg/kg). Grupo 7 (Óleo essencial de guavira, via intraperitoneal, 45mg/ml). Grupo 8 (Óleo essencial de guavira 3%, via tópica).

Salomão et al., 2024 avaliou a atividade antitumoral de dois extratos de frutos de *Campomanesia adamantium* em modelos *in vitro* e *in vivo* de metástase pulmonar de melanoma. Extratos de polpa e casca foram extraídos de frutas frescas utilizando diclorometano como solvente. Os resultados indicaram GI_{50} próximo ou abaixo de 30 e efeito citocida sobre algumas linhagens tumorais, assim como também apresentaram um alto índice de seletividade, principalmente para células de de

glioma (U-251) e leucemia (K562), sem o comprometimento das células não tumorais. No ensaio in vivo, em modelo de metástase pulmonar houve inibição do crescimento tumoral e redução da implantação metastática tumoral nos pulmões, sem apresentar toxicidade aos animais.

Lima e Silva *et al.* (2018) descreve grande potencial antiproliferativo *in vitro* do extrato do fruto da guavira e de cinco isolados ativos com ação antiproliferativa sobre as células cancerígenas, podendo ser considerado um potencial agente anticâncer para o tratamento da doença.

Estes resultados, embora com extratos das folhas da guavira, corroboram com os resultados encontrados em nosso estudo, com óleo essencial, tanto in vitro quanto em modelo animal, indicando o potencial efeito antitumoral desta planta necessitando assim de mais pesquisas sobre seus compostos ativos.

6 Conclusões

O método utilizado para extração de óleos essenciais foi de hidrodestilação por arraste a vapor e o rendimento obtido foi de 0.023%.

O perfil químico do óleo das folhas da guavira identificou 32 substâncias, dentre estas: biciclogermacreno com 16.86%, linalool 7,01%, germacreno D 7,14%, *E*-cariofileno 6.38% limoneno 5.39%, α -terpineol 4.70%.

O óleo não apresentou atividade citotóxica em células de fibroblastos murino e em células endoteliais do cordão umbilical ($GI_{50} > 250\mu\text{g/ml}$).

O óleo essencial demonstrou atividade citotóxica contra células de melanoma murino B16F10. A citotoxicidade em células normais (fibroblastos murinos 3T3 e células endoteliais de cordão umbilical humano - HUVEC) foi mínima, sugerindo seletividade para células tumorais.

Houve sinais de intoxicação bem evidentes na dose mais elevada (2000mg/kg), os camundongos tratados com 300 mg/kg apresentaram sinais moderados de intoxicação, porém, nas doses de 50mg/kg e 5 mg/kg não houve alteração de comportamento, indicando baixa toxicidade.

Nos experimentos de atividade anticâncer ocorreu diminuição do peso e volume dos nódulos dos animais tratados com o óleo essencial das folhas da guavira nas diferentes concentrações e vias de administração do óleo essencial

A aplicação do óleo de guavira a 3% foi a via que apresentou a maior redução do peso tumoral (87,93%)

A administração do óleo essencial por gavagem (300 mg/kg) e aplicação tópica (3%) resultou em redução significativa no peso e volume tumoral em camundongos com melanoma. Os resultados foram comparáveis ao tratamento com Doxorubicina, demonstrando o potencial anticâncer do óleo essencial.

7 Considerações finais

Os estudos demonstraram que o óleo essencial da folha da guavira apresenta efeito anticâncer *in vitro* e *in vivo* e podem servir como potencial agente anticâncer para o melanoma. Os resultados promissores incentivam o avanço da pesquisa, uma vez que o óleo não apresentou citotoxicidade nas linhagens normais testadas, corroborando com o resultado da toxicidade oral aguda até a concentração de 2000mg/Kg de peso.

Estudos futuros sobre mecanismo de ação, toxicidade crônica, mutagenicidade devem ser realizados a fim de contribuir para o avanço de novos agentes anticâncer advindos da biodiversidade do cerrado.

8 Referências

ADAMS, Robert P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 5. ed. online. Gruver, TX: Texensis Publishing, 2017.

ALSHAMSAN, Aws. STAT3-siRNA induced B16. F10 melanoma cell death: more association with VEGF downregulation than p-STAT3 knockdown. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 8, p. 1083-1088, 2018.

ALVES, C. C. F. et al. Antiproliferative activity of essential oils from three plants of the Brazilian Cerrado: *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), *Protium ovatum* (Burseraceae) and *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae). *Brazilian Journal of Biology*, v. 80, n. 2, p. 290-294, 2020.

ALVES, M. de J. et al. Fenóis, flavonoides e atividade antioxidante e citotóxica de folhas, frutos, cascas de frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae-Mimosoideae), 2014.

AMRATI, Fatima Ez-Zahra et al. Traditional medicinal knowledge of plants used for cancer treatment by communities of mountainous areas of Fez-Meknes, Morocco. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 29, n. 10, p. 1185-1204, 2021.

ANDRADE, Luciana Nalone et al. Contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de tratamentos para o câncer. *Caderno de Graduação: Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE*, v. 5, n. 2, p. 119-119, 2018.

DE ARAUJO, Fabio Fernandes et al. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food research international**, v. 121, p. 57-72, 2019.

DE MELANOMA, GRUPO BRASILEIRO. *Melanoma*. São Paulo: **Visana Comunicações**, v. 76, 2017.

BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BISHAYEE, Anupam; SETHI, Gautam. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. In: *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 2016. p. 1-3.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CAIXETA, Gabriella Gonçalves et al. Benefícios do uso dos óleos essenciais como ansiolíticos: revisão de literatura. *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, v. 5, n. 5, p. 5381-5396, 2023.

CARDOSO, Claudia Andrea Lima; CATELAN, Taline Baganha Stefanello. *Campomanesia adamantium*, *C. pubescens*, *C. xanthocarpa*, *C. guazumifolia* and *C.*

sessiliflora. Fruits of the Brazilian Cerrado: Composition and Functional Benefits, p. 35-52, 2021.

CONCEIÇÃO, L. O.; AOYAMA, E. M. Leaf anatomy and histochemistry of species known as stonebreaker (*Euphorbia prostrata* Aiton, *Euphorbia hyssopifolia* L., *Phyllanthus amarus* Schumacher, Thonn, and *Phyllanthus tenellus* Roxb.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 571-581, 2016.

COSTA, Victor Roberto Santos; DE MENEZES LINS, Eduarda; DA SILVA, Lilia Samara. The impact of health literacy on breast cancer prevention: O impacto do letramento em saúde na prevenção do câncer de mama. **Concilium**, v. 23, n. 17, p. 307-326, 2023.

COSTA-LOTUFO, Leticia V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COUTINHO, Isabel D. et al. Influência da variação sazonal nos teores de flavonoides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 322-327, 2010.

COUTINHO, Isabel D.; POPPI, N. R.; CARDOSO, C. L. Identificação dos compostos voláteis de folhas e flores em Guavira (*Campomanesia adamantium* O. Berg.). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 5, p. 405-407, 2008.

COUTINHO, Isabel Duarte et al. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**, v. 33, p. 53-60, 2008.

COUTINHO, Isabel Duarte 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**, v. 45, p. 767-776, 2009.

CRAGG, Gordon M.; GROTHAUS, Paul G.; NEWMAN, David J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Plantas como fonte de agentes anticâncer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J.; SNADER, Kenneth M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

CRAGG, Gordon M.; PEZZUTO, John M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. Suppl. 2, p. 41-59, 2016.

CULP, T. D. et al. Papillomavirus particles assembled in 293TT cells are infectious in vivo. **Journal of Virology**, v. 80, n. 22, p. 11381-11384, 2006.

DA SILVA, Bernardo Coupêe Gonçalves et al. Câncer de pele e os perigos dos raios UV. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 11, p. e135111133557, 2022.

DA SILVA, Vanessa Bernardino et al. Terapia fotodinâmica no tratamento de lesões em câncer de pele não melanoma: revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e7410111257, 2021.

D'ANGELIS, A. S. R.; NEGRELLE, R. R. B. Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) Landrum: aspectos botânicos, ecológicos, etnobotânicos e farmacológicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 607-617, 2014.

DANH, Luu Thai et al. Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 70, p. 27-34, 2012.

DE CEBALLOS, Albanita Gomes da Costa et al. Exposição solar ocupacional e câncer de pele não melanoma: estudo de revisão integrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 3, p. 251-258, 2014.

DE SOUSA NETO, Benedito Pereira et al. Animais como modelos experimentais nos cursos de graduação na área da saúde: revisão sistemática. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 50, p. e2878, 2020.

DE VRIES, Elisabeth et al. Known and potential new risk factors for skin cancer in European populations: a multicentre case-control study. **British Journal of Dermatology**, v. 167, n. s2, p. 1-13, 2012.

DEMINICE, Rafael. Exercício físico no tratamento do câncer: evidências científicas e contexto brasileiro. **JPhys Educ**, v. 33, p. e3201, 2022.

DURAN, Angeles et al. p62/SQSTM1 by binding to vitamin D receptor inhibits hepatic stellate cell activity, fibrosis, and liver cancer. **Cancer cell**, v. 30, n. 4, p. 595-609, 2016.

EDRIS, Amr E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ERICKSON, Corinne; MILLER, Stanley J. Treatment options in melanoma in situ: topical and radiation therapy, excision and Mohs surgery. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 5, p. 482-491, 2010.

FEITOZA, Lais Quelen; DE SOUZA TERRA, Fábio; GRASSELLI, Cristiane da Silva Marciano. Plantas medicinais e seus compostos com potencial terapêutico no tratamento do câncer: revisão integrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 1, 2021.

FRESHNEY, R. I. Cultura de tipos específicos de células. Cultura de células animais: um manual de técnica básica. 2005.

GIORDANI, C.; SANTIN, R.; CLEFF, M. B. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-Candida no período de 2005-2013. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 175-185, 2015.

GOMES, Alcir Teixeira et al. Antibacterial activity of orsellinates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 194-196, 2003.

GULLO, Vincent P. et al. Drug discovery from natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 7, p. 523-531, 2006.

HAQUE, Abedul; BRAZEAU, Daniel; AMIN, Arm R. Perspectives on natural compounds in chemoprevention and treatment of cancer: an update with new promising compounds. **European Journal of Cancer**, v. 149, p. 165-183, 2021.

HAUSMAN, Daniel M. What is cancer? *Perspectives in Biology and Medicine*, v. 62, n. 4, p. 778-784, 2019.

HELLER, L. et al. Growth environment influences B16.F10 mouse melanoma cell response to gene electrotransfer. **Bioelectrochemistry**, v. 140, p. 107827, 2021.

HERZI, Nejia et al. Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: Yield, chemical composition and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3537-3545, 2013.

HURWITZ, Stephanie N. et al. Proteomic profiling of NCI-60 extracellular vesicles descobre carga proteica comum e biomarcadores específicos do tipo de câncer. **Oncotarget**, v. 7, n. 52, p. 86999, 2016.

INDRAYANTO, Gunawan; PUTRA, Galih Satrio; SUHUD, Farida. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. **Profiles of drug substances, excipients and related methodology**, v. 46, p. 273-307, 2021.

HYLDGAARD, Morten; MYGIND, Tina; MEYER, Rikke Louise. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 12, 2012.

IJAZ, Shakeel et al. Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1643-1651, 2018

INCA. Estimativa 2016. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>. Acesso em: 11 jan. 2017.

JUNQUEIRA JUNIOR, Gerson et al. Modelo experimental de melanoma em camundongos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 487-489, 1997.

KALLIFATIDIS, Georgios; HOY, James J.; LOKESHWAR, Bal L. Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer. In: *Seminars in Cancer Biology*. **Academic Press**, 2016. p. 160-169.

LIMBERGER, Renata P. et al. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, p. 916-919, 2004.

LIMA, H. R. P. et al. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta Ambiente*, v.10, p.71-77, 2003

MACHADO, Marília Pereira et al. Efeito da secagem natural e artificial da biomassa foliar de *Piper hispidinervum* na composição química do óleo essencial. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 1, p. 265-270, 2013.

MACIEL, M. A. M. et al. Aspectos sobre produtos naturais na descoberta de novos agentes antitumorais e antimutagênicos. 2007.

MATTOS, Gerson et al. Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 23, p. 3735-3744, 2018.

PEREIRA DE MENEZES FILHO, Antonio Carlos; CRUVINEL DE SOUSA, Wendel; DE SOUZA CASTRO, Carlos Frederico. Composição química dos óleos essenciais de *Schinus molle* e atividade antifúngica em *Sclerotinia sclerotiorum*. In: *Colloquium Agrariae*. 2020.

MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira de; CASTRO, Carlos Frederico de Souza. Identificação das classes de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de *Campomanesia adamantium*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Kielmeyera lathrophytum* e *Solanum lycocarpum*. *Estação Científica*, v. 9, n. 1, p. 89-101, 2019.

MONKS, Anne 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*, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MUNHOZ. American Cancer Society. 2019. Disponível em: <www.cancer.org>. Acesso em: setembro 2024.

NASCIMENTO, K.F., MOREIRA, F.M.F., ALENCAR SANTOS, J., KASSUYA, C.A.L., CRODA, J.H.R., CARDOSO, C.A.L., VIEIRA, M.D.C., GÓIS RUIZ, A.L.T., ANN FOGGIO, M., CARVALHO, J.E. and FORMAGIO, A.S.N., 2018. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 210, pp. 351-358. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.030>. PMID:28844678

NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer statistics**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What is cancer?** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#related-diseases>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

NAKAMURA, Kazuki et al. Caracterização de linhagens de células de melanoma de camundongo por sua malignidade mortal usando um modelo metastático experimental. *Life Sciences*, v. 70, n. 7, p. 791-798, 2002.

NETO, Pedro Luiz de Oliveira Costa. **Estatística**. Editora Blucher, 2002

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Plant endophytes and epiphytes: burgeoning sources of known and “unknown” cytotoxic and antibiotic agents. *Planta medica*, v. 86, n. 13/14, p. 891-905, 2020.

OLIVEIRA, J. D. et al. Rendimento, composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de folhas de *Campomanesia adamantium* submetidas a diferentes métodos de secagem. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 18, p. 502-510, 2016.

PASCOAL, Aislan CRF et al. Free radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-DAD/ESIMS profile of *Campomanesia adamantium* leaves. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 1934578X1100600711, 2011.

PASCOAL, Aislan Cristina Rheder Fagundes 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**, v. 19, n. 2, p. 1843-1855, 2014.

PAVAN, Fernando Rogério et al. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 1221-1226, 2009.

PETTAN-BREWER, Christina et al. B16 melanoma tumor growth is delayed in mice in an age-dependent manner. *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases*, v. 2, n. 1, p. 19182, 2012.

IRES, Carla Andréa Avelar et al. Câncer de pele: caracterização do perfil e avaliação da proteção solar dos pacientes atendidos em serviço universitário. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 54-59, 2018.

RAMOS, Diovany Doffinger; CARDOSO, Claudia Andréa Lima. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 774-776, 2007.

RIBEIRO, Luan Marlon et al. Caracteres morfoanatômicos de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, uma planta medicinal do cerrado brasileiro. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 17, n. 1, p. 117-125, 2020.

TORRE, Lindsey A. et al. Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: Converging incidence in males and females. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 3, p. 182-202, 2016.

ROSTAGNO, M. A.; PRADO, J. M. (Eds.). Extração de produtos naturais: princípios e aplicações. **Royal Society of Chemistry**, 2015.

SALMAZZO, Gustavo R. Flavonoids and antioxidant activity of ethanolic extract of *Campomanesia adamantium* fruits; Flavonoides e atividade antioxidante do extrato etanólico dos frutos de *Campomanesia adamantium*. 2010.

SALOMÃO, Evelyn de Andrade et al. New Evidence on the Antiproliferative Activity of Campomanesia Adamantium (Cambess.) O. Berg Extracts in Melanoma Lung Metastasis. **Journal of Medicinal Food**, 2024

SANTANA, Edson Renan Barros de. Composição química, atividade antimicrobiana, potencial antioxidante e avaliação da citotoxicidade de compostos de Eugenia brejoensis (Myrtaceae). 2020.

SANTIAGO, Gabriela Godoy. Estudo e identificação dos principais componentes do óleo essencial de Ocotea corymbosa (Meisn.) Mez (Lauraceae) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e por índice de retenção. 2022.

SANTOS, A. S. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. 2004.

SANTOS, Thalita Gilda et al. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de Piper malacophyllum (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, p. 477-481, 2012.

SANTOS-LIMA, T. M. et al. Medicinal plants with antiparasitic action: Traditional knowledge of the Kantaruré ethnic group, Baixa das Pedras village, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 240-247, 2016.

SÁ, Stone et al. Phytochemistry and antimicrobial activity of Campomanesia adamantium. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 303-311, 2018.

SHERWOOD, Edward R.; TOLIVER-KINSKY, Tracy. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SILVA, E. A. J. et al. Antibacterial and antiproliferative activities of the fresh leaf essential oil of Psidium guajava L. (Myrtaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 4, p. 697-702, 2018.

SILVA, Magalli CB Lima E. 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**, v. 21, n. 10, p. 1024-1034, 2018.

SILVA, Marcelo Fontes da. Potencial genotóxico e citotóxico de óleos essenciais de plantas do Cerrado e Pantanal Sul-mato-grossense. 2023.

SILVEIRA, Jeniffer Cristina et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, 2012.

SIMÕES, Layse Roesler; PILLA DELLA MÉA, C.; THOMÉ FERREIRA, V. R. Sintomas de ansiedade e estresse em pacientes submetidos à quimioterapia. **Perspectivas em Psicologia**, v. 25, n. 1, p. 66-84, 2022.

SKEHAN, Philip et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SMITH, Judith A. et al. Uma avaliação da citotoxicidade do tratamento combinado de taxano e agentes de platina em um painel de linhagens de células de carcinoma ovariano humano. **Gynecologic Oncology**, v. 98, n. 1, p. 141-145, 2005.

STECKELBERG, Rosa Maria de Brito. Perspectivas em pesquisas sobre o gênero *Campomanesia*; estudos fitoquímicos e investigação de atividades biológicas em *Campomanesia guazumifolia* (Cambess) O. Berg-Myrtaceae. 2022.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Óleo essencial de *Gochnatia polymorpha* (LESS) CABR. Ssp *floccosa* Cabr. *Quim. Nova*, v.29, p.999-1002, 2006.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Métodos em bioquímica vegetal. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry**. 1991.

SUGGITT, Marie; BIBBY, Michael C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 971-981, 2005.-

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

SYED, Deeba N. et al. Explorando os alvos moleculares do flavonoide dietético fisetina no câncer. In: Seminários em Biologia do Câncer. **Academic Press**, p. 130-140. 2016.

TALMADGE, James E. et al. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

TRIVELLA, Daniela Barretto Barbosa et al. Descoberta de fármacos a partir de produtos naturais e a abordagem Molecular Power House (MPH). **Revista Fitos**, v. 16, n. Supl. 2, p. 176-192, 2022.

VALADARES, Marize C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50 “. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2006.

VALLILO, Maria Isabel; DE AGUIAR, Osny Tadeu; BUSTILLOS, Oscar Vega. Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg–Myrtaceae. **Revista do Instituto Florestal**, v. 18, p. 15-22, 2006.

VASCONCELOS, Sarah Carvalho et al. Composição química, atividade bactericida e antioxidante dos óleos essenciais das folhas de *Ocimum basilicum* e *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e518108171109-e518108171109, 2021.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, Vanessa et al. Quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 34, 2020.

VISCARDI, D. Z. et al. Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. **PloS One**, v. 12, n. 2, p. 157107, 2017.

WHO. World Cancer Report 2014. Disponível em: <http://www.thehealthwell.info/node/725845>.

ZHAO, Wanzhou et al. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. **Cancer Letters**, v. 162, p. S49-S55, 2001.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito anticâncer in vivo e in vitro do óleo essencial extraído da folha da guavira (*Campomanesia adamantium*)", registrada com o nº 1.292/2023, sob a responsabilidade de Danielle Bogo - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 10/11/2023.

Finalidade	() Ensino	(x) Pesquisa
Vigência da Autorização	10/12/2023 a 10/12/2024	
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /BALB-c	
Nº de animais	93	
Peso/Idade	25-30g/2 semanas	
Sexo	78 machos e 15 fêmeas	
Origem	Biotério Central da UFMS	

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 07 de 12 de 2023

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por Fábio José Carvalho Faria, Presidente de Comissão, em 06/02/2024, às 10:14, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4524217 e o código CRC 9EEEE480.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Diversas plantas são conhecidas por contribuírem no desenvolvimento de substâncias anticancerígenas, conforme apontado na literatura. Entre essas plantas, destacam-se: *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), *Taxus baccata* L. (Taxaceae), *Catharanthus roseus* L. G. Don. (Apocynaceae), *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae), *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae), *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) e *Capraria biflora* L. Estas espécies deram origem a medicamentos importantes, tais como paclitaxel, docetaxel, vincristina, vimblastina, irinotecan, topotecan, etoposídeo, eteniposídeo, piplartina e biflorina. Os mecanismos de ação desses compostos estão relacionados com os microtúbulos, o ciclo celular e as tubulinas celulares, resultando na inibição do ciclo celular e na indução da apoptose. A utilização de extratos naturais na produção de fármacos é respaldada pela legislação e têm se mostrado eficazes no tratamento do câncer (FREIRE E ALVES, 2014).