

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE ÓLEOS**  
**ESSENCIAIS DE *Virola surinamensis* (ROL.) WARB.**  
**(MYRISTICACEAE)**

**TALITA ANDRADE DA ANUNCIAÇÃO**

**Salvador – Bahia**

**2021**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**

**Investigativa**

**POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
*Viola surinamensis* (ROL.) WARB. (MYRISTICACEAE)**

**TALITA ANDRADE DA ANUNCIAÇÃO**

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

Co-orientadora: Dra. Rosane Borges Dias

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

**Salvador – Bahia**

**2021**

"POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Viola surinamensis* (ROL.) WARB.  
(MYRISTICACEAE)"

TALITA ANDRADE DA ANUNCIÇÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO

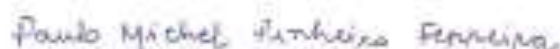
Salvador, 19 de janeiro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Thassila Nogueira Pitanga  
Professora  
UCSAL



---

Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira  
Professor Associado II  
UFPI



---

Dr. Jaime Ribeiro Filho  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

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

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM);

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB);

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz - RJ).

Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas.

- Carl Sagan

## AGRADECIMENTOS

O ano de 2020 não foi o que poderíamos chamar de comum, nossas questões e sentimentos ficaram ainda mais amplificadas e para mim não foi diferente, tive muita dificuldade em conceber esse trabalho final. Desânimo, frustrações, ansiedade, sintomas de depressão, tudo afetou. Escrever esse agradecimento é certeza que essa fase está chegando ao fim e eu espero que a próxima fase seja melhor para todos nós.

Portanto, em primeiro lugar eu gostaria de agradecer aos céus por ter conseguido chegar até pelo menos a etapa da escrita e ao meu apoio e base familiar, apesar de tudo sempre estiveram do meu lado e vibram com cada conquista mínima. As minhas irmãs, Taise e Taiana, além da amizade, mas também as revisões e dicas para os trabalhos. Sirius, Marie e meus gatos pela companhia diária.

A Fiocruz – Rio pela concessão da bolsa e extensão da mesma. A Fiocruz – BA por toda estrutura necessária para finalização desse projeto, incluindo aqui as plataformas multiusuários de microscopia, citometria, serviço de histotecnologia, biotério e biblioteca. E principalmente a Alan, pela amizade, companhia e apoio nas análises de citometria.

Aos meus orientadores por todas as contribuições essenciais para finalização desse trabalho e a equipe Câncer – LETI. Aos colaboradores da equipe: Dr. Hector Koolen (UEA) e Emanuel Vilaça (UFAM) pelos Óleos Essenciais e Dra. Clarissa Gurgel pela análise patológica. As bancas avaliadoras da seleção, qualificação e defesa do mestrado.

Aos amigos que conquistei desde a graduação principalmente Ícaro, Luís, Bianca e Andresa. Aos colegas Biotecs de outros estados. E aos demais amigos de fora da área.

Por último, esse trabalho seria impossível sem o uso advento da cultura de células extraídas de pessoas (muitas vezes sem consentimento), além de agradecimento a vocês, espero que esse singelo trabalho ajude a contribuir a importância de vocês na história da ciência: a Henrietta Lacks e todos os outros doadores de células agora distribuídas ao redor do mundo. E aos animais de laboratório, infelizmente ainda essencial ao desenvolvimento das pesquisas.

ANUNCIAÇÃO, Talita Andrade. Potencial antineoplásico de óleos essenciais de *Virola surinamensis* (ROL.) WARB. (MYRISTICACEAE), Brasil. 79 f. il. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2020.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** *Virola surinamensis* (Rol. Ex Rottb.) Warb. (Myristicaceae), popularmente conhecida no Brasil como “mucuíba”, “ucuúba”, “ucuúba-branca” ou “ucuúba do igapó”, é uma planta medicinal usada para tratar uma variedade de doenças, incluindo infecções, processos inflamatórios e câncer. **OBJETIVO:** No presente trabalho, investigamos os constituintes químicos e a inibição *in vitro* e *in vivo* de células de carcinoma do cólon humano, HCT116, por óleos essenciais obtidos de casca (OEC) e das folhas (OEF) de *V. surinamensis*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Os OEC e OEF foram obtidos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa. A atividade citotóxica *in vitro* foi determinada em células cancerígenas HCT116, HepG2, HL-60, B16-F10 e MCF-7 e em linhagem celular não cancerígena MRC-5 pelo ensaio do Alamar Blue após 72 h de tratamento. Os efeitos do OE na externalização da fosfatidilserina (Ensaio de Anexina V/Iodeto de propídio), no potencial transmembranar mitocondrial e na distribuição do ciclo celular foram avaliados por citometria de fluxo em células HCT116, após 24 e 48 h de tratamento. As células também foram coradas com May-Grunwald-Giemsa para análise da morfologia celular após tratamento com os OE. A atividade antitumoral *in vivo* foi avaliada em camundongos C.B-17 SCID com células HCT116 em modelo de xenotransplante. **RESULTADOS:** Os principais constituintes do OEC foram aristoleno (28,0 ± 3,1%), α-gurjuneno (15,1 ± 2,4%), valenceno (14,1 ± 1,9%), germacreno D (7,5 ± 0,9%), δ-guaieno (6,8 ± 1,0%) e elemento β (5,4 ± 0,6%). Por outro lado, o OEF exibiu α-farneseno (14,5 ± 1,5%), β-elemeno (9,6 ± 2,3%), biciclogermacreno (8,1 ± 2,0%), germacreno D (7,4 ± 0,7%) e α-cubebeno (5,6 ± 1,1%) como constituintes principais. OEC mostrou valores de Cl<sub>50</sub> para células cancerígenas variando de 9,41 a 29,52 µg/mL para HCT116 e B16 - F10, enquanto a OEF mostrou valores de Cl<sub>50</sub> para células cancerígenas que variam de 7,07 a 26,70 µg/mL para HepG2 e HCT116, respectivamente. O valor de Cl<sub>50</sub> para células não cancerígenas MRC-5 foi de 34,7 e 38,93 µg/mL para OEC e OEF, respectivamente. Ambos os óleos induziram morte

celular do tipo apoptótico em células HCT116, como observado pelas características morfológicas de apoptose, externalização da fosfatidilserina, despolarização mitocondrial e fragmentação do DNA internucleossômico. Na dose de 40 mg/kg, as taxas de inibição da massa tumoral foram de 57,9 e 44,8% nos animais tratados com OEC e OEF, respectivamente. **CONCLUSÃO:** Os resultados do presente estudo indicam os óleos essenciais da *V. surinamensis* como possível medicamento fitoterápico no tratamento do câncer de cólon.

**Palavras-Chave:** HCT116; Morte celular; Myristicaceae; *Virola surinamensis*.



ANUNCIAÇÃO, Talita Andrade. Antineoplastic potential of essential oils of *Virola surinamensis* (ROL.) WARB. (MYRISTICACEAE), Brazil. 79 p. il. Dissertation (Master's degree) - Fundação Oswaldo Cruz, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, 2011.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb. (Myristicaceae), popularly known in Brazil as “mucuíba”, “ucuúba”, “ucuúba-branca” or “ucuúba do igapó”, is a medicinal plant used to treat a variety of diseases, including infections, inflammatory processes and cancer.

**OBJECTIVE:** In the present work, we investigated the chemical constituents and the *in vitro* and *in vivo* inhibition of human colon carcinoma HCT116 cells by essential oils obtained from the bark (EOB) and leaves (EOL) of *V. surinamensis*.

**MATERIALS AND METHODS:** EOB and EOL were obtained by hydrodistillation and analyzed via gas chromatography with flame ionization detection and gas chromatography coupled to mass spectrometry. *In vitro* cytotoxic activity was determined in cultured cancer cells HCT116, HepG2, HL-60, B16-F10 and MCF-7 and in a non-cancerous cell line MRC-5 by the Alamar blue assay after 72 h of treatment. Annexin V/propidium iodide staining, mitochondrial transmembrane potential and cell cycle distribution were evaluated by flow cytometry in HCT116 cells treated with essential oils after 24 and 48 h of treatment. The cells were also stained with May-Grunwald-Giemsa to analyze cell morphology. *In vivo* antitumor activity was evaluated in C.B-17 SCID mice with HCT116 cells. **RESULTS:** The main constituents in EOB were aristolene ( $28.0 \pm 3.1\%$ ),  $\alpha$ -gurjunene ( $15.1 \pm 2.4\%$ ), valencene ( $14.1 \pm 1.9\%$ ), germacrene D ( $7.5 \pm 0.9\%$ ),  $\delta$ -guaiene ( $6.8 \pm 1.0\%$ ) and  $\beta$ -element ( $5.4 \pm 0.6\%$ ). On the other hand, EOL displayed  $\alpha$ -farnesene ( $14.5 \pm 1.5\%$ ),  $\beta$ -elemene ( $9.6 \pm 2.3\%$ ), bicyclogermacrene ( $8.1 \pm 2.0\%$ ), germacrene D ( $7.4 \pm 0.7\%$ ) and  $\alpha$ -cubebene ( $5.6 \pm 1.1\%$ ) as main constituents. EOB showed  $IC_{50}$  values for cancer cells ranging from 9.41 to 29.52  $\mu\text{g/mL}$  for HCT116 and B16-F10, while EOL showed  $IC_{50}$  values for cancer cells ranging from 7.07 to 26.70  $\mu\text{g/mL}$  for HepG2 and HCT116, respectively. The  $IC_{50}$  value for a non-cancerous MRC-5 cell was 34.7 and 38.93  $\mu\text{g/mL}$  for EOB and EOL, respectively. Both oils induced apoptotic-like cell death in HCT116 cells, as observed by the morphological characteristics of apoptosis, externalization of phosphatidylserine, mitochondrial depolarization and fragmentation of internucleosomal DNA. At dose of 40 mg/kg, tumor mass inhibition rates were 57.9 and 44.8% in animals treated with EOB and EOL, respectively. **CONCLUSION:** These data indicate *V. surinamensis* as possible herbal medicine in the treatment of colon cancer.

**Key words:** HCT116; Cell death; Myristicaceae; *Virola surinamensis*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Marcadores do câncer (Hallmarks of câncer). Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.....22
- Figura 2. Dados taxonômicos da *Virola surinamensis* e imagens de folha e casca da planta. Adaptado de GALUPPO e CARVALHO, 2001.....30
- Figura 3. Efeito dos óleos essenciais de casca e folhas (OEC e OEF, respectivamente) de *Virola surinamensis* na viabilidade celular de células HCT 116 através de experimento com azul de tripam, após 24h (A) e 48h (B) de tratamento.....47
- Figura 4. Efeito dos OE de casca (OEC) e folhas (OEF) de *V. surinamensis* na indução de morte celular em células HCT 116, analisadas por citometria de fluxo utilizando Anexina V-FITC/PI após 24 (A) e 48 (B) h de tratamento.....47
- Figura 5. Histogramas representativos da distribuição do ciclo celular de células HCT116 tratadas com óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* após 24 (A) e 48 (B) h de tratamento.....49
- Figura 6. Efeito dos OF de casca (OEC) e folhas (OEF) de *V. surinamensis* na distribuição do ciclo celular em células HCT 116, analisadas por citometria de fluxo.....51
- Figura 7. Representações dos *Dot plots* de citometria de fluxo representativas da indução de morte celular de células HCT116 tratadas com óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis*, medidas por citometria de fluxo usando coloração com Anexina V-FITC/PI após 24 (A) e 48 (B) h de tratamento.....52
- Figura 8. Efeito do óleo essencial de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* no potencial da membrana mitocondrial de células HCT116, determinado por citometria de fluxo usando o corante rodamina 123 após 24h de tratamento.....53

Figura 9. Efeito dos óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) de <i>Virola surinamensis</i> na morfologia de células HCT116 após 24 (A) e 48 (B) h tratamento.....	54
Figura 10. Efeito dos óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) in vivo em camundongos C.B-17 SCID em modelo xenográfico com células HCT116.....	55
Figura 11. Análises histológicas dos tumores. Coloração com hematoxilina e eosina analisado por microscopia óptica.....	58
Figura 12. Análises histológica representativas dos pulmões, fígado e rins corados com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia óptica.....	60
Figura 13. Resumo gráfico dos resultados in vitro do trabalho. Elaborado de forma didática para futuras publicações. Criada a partir de figuras SMART – Servier Medical Art.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa dos 10 tipos de cânceres mais incidentes na população brasileira para o ano de 2020.....	25
Tabela 2. Principais usos em suas diferentes formas da <i>Virola surinamensis</i> encontrados nas referências bibliográficas.....	31
Tabela 3. Linhagens celulares utilizadas para o experimento de viabilidade celular pelo método de Alamar Blue.....	35
Tabela 4. Composição química do óleo essencial de casca (OEC) e folhas (OEF) de <i>Virola surinamensis</i> .....	42
Tabela 5. Valores de CI50, citotoxicidade dos óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) de <i>Virola surinamensis</i> .....	45
Tabela 6. Índice de seletividade do óleo essência de casca (OEC) e folhas (OEF) de <i>Virola surinamensis</i> .....	46
Tabela 7. Efeito do óleo essencial de casca (OEC) e folhas (OEF) de <i>Virola surinamensis</i> no corpo e peso relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID em modelo de xenoenxerto de células HCT116.....	56
Tabela 8: Efeito do óleo essencial de casca (OEC) e folhas (OEF) de <i>Virola surinamensis</i> nos parâmetros hematológicos do sangue periférico de amostras dos camundongos C.B-17 SCID em modelo de xenoenxerto de células HCT116.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

µg	Micrograma
µL	Microlitro
5-Fu	5-Fluorouracil
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de variância)
ATCC	American Type Culture Collection
CG-DIC	Cromatografia gasosa - Detector por Ionização de Chama (sigla em português)
CG-EM	Cromatografia gasosa - Espectrômetro de massa (sigla em português)
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
E.P.M./S.E.M.	Erro padrão da média
GC-FID	Cromatografia gasosa - Detector por Ionização de Chama (sigla em inglês)
GC-MS	Cromatografia gasosa - Espectrômetro de massa (sigla em inglês)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonia
IP	Iodeto de Propídio
IS	Índice de Seletividade
MMA	Ministério do Meio Ambiente
OEC	Óleo Essencial das cascas de <i>Viola surinamensis</i> (sigla em português)
OEF	Óleo Essencial das folhas de <i>Viola surinamensis</i> (sigla em português)
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético

---

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1.	CÂNCER: ASPECTOS GERAIS.....	17
2.2.	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER.....	19
2.3.	TRATAMENTO E FARMACOLOGIA DO CÂNCER.....	20
2.4.	PRODUTOS NATURAIS.....	22
2.5.	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	23
2.6.	<i>Virola surinamensis</i> (ROL.) WARB. (MYRISTICACEAE).....	24
3.	OBJETIVOS.....	27
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4.	METODOLOGIA.....	28
4.1.	OBTENÇÃO DA PLANTA <i>Virola surinamensis</i> .....	28
4.2.	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
4.4.	ENSAIOS IN VITRO.....	29
4.4.1.	Obtenção e manutenção das células em cultura.....	29
4.4.2.	Avaliação da Citotoxicidade – Método de Alamar Blue.....	30
4.4.3.	Ensaio da Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripam.....	31
4.4.4.	Determinação do Ciclo Celular e Fragmentação do DNA.....	32
4.4.5.	Determinação da Externalização da Fosfatidilserina.....	33
4.4.6.	Determinação da Despolarização Mitocondrial.....	33
4.4.7.	Análise morfológica – Coloração diferencial May-Grunwald-Giemsa.....	34
4.5.	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO.....	35
4.5.1.	Delineamento do Ensaio in vivo.....	35
4.5.2.	Avaliação do perfil hematológico, morfológico e tecidual.....	35
4.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
5.	RESULTADOS.....	37
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	37
5.2.	ENSAIOS IN VITRO.....	39
5.2.1.	Efeito dos óleos essenciais de casca e folhas de <i>Virola surinamensis</i> sobre a viabilidade de células cancerígenas.....	39
5.2.2.	Efeito dos óleos essenciais de casca e folhas de <i>V. surinamensis</i> sobre o Ciclo Celular.....	43
5.2.3.	Efeito dos dos óleos essenciais de casca e folhas de <i>Virola surinamensis</i> sobre a Externalização da Fosfatidilserina.....	45

5.2.4. Efeito dos óleos essenciais (OEC e OEF) sobre a Despolarização Mitocondrial .....	48
5.2.5. Efeito dos OE estudados na morfologia das células HCT 116.....	48
5.3. EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA CASCA E FOLHAS DE VIROLA SURINAMENSIS SOBRE A ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VIVO.....	50
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO .....	62
REFERÊNCIAS .....	63
APÊNDICE .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

Novos medicamentos são desenvolvidos a cada dia na indústria farmacêutica, todavia, muitas doenças complexas continuam sem tratamento específico ou eficiente, como o câncer. Essas doenças cancerígenas são responsáveis por grande parte das causas de mortes, mundialmente, e permanecem sendo um desafio farmacológico. O câncer é formado por um conjunto de diversas doenças caracterizadas pela proliferação desordenada de células e capacidade de invasão de outros tecidos (CAO *et al.*, 2011).

As características marcantes do câncer são essenciais para compreensão dos mecanismos da doença e estratégias medicamentosas, foram descritas por Hanahan e Weinberg (2000), e, posteriormente, revisitadas em 2011 pelos mesmos autores. Dentre as características fenotípicas do câncer destacam-se a proliferação celular independente de estímulos, imortalidade, produção de fatores de crescimento tumorais, resistência a apoptose, angiogênese, metástase e supressão de fatores de regulação celular são algumas dessas características (HANAHAN e WEINBERG, 2000; HANAHAN e WEINBERG, 2011; INCA, 2011).

Trata-se de uma doença em plena expansão, considerando o envelhecimento da população e a carga de fatores ambientais em que a população é exposta diariamente. A última estimativa da GLOBOCAN/IARC (2018), estimou 18,1 milhões de novos casos de câncer a nível mundial para o ano de 2018 (BRAY *et al.*, 2018). O Instituto Nacional do Câncer estima que, para o Brasil, serão 625 mil novos casos a cada ano no triênio 2020-2022 (INCA, 2020).

Os estudos epidemiológicos reforçam a necessidade de novos medicamentos mais efetivos, sendo os recursos naturais, principalmente aqueles encontrados na vasta vegetação brasileira, essenciais para a busca ativa de novos medicamentos para o câncer e diversas outras enfermidades. Deve-se considerar que cerca de 75% dos fármacos antineoplásicos em uso clínico são produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN e CRAGG, 2020). Nesta concepção, óleos essenciais são metabólitos secundários encontrados em diversas espécies vegetais que atraem o interesse da comunidade científica em busca de novos tratamentos para várias comorbidades, destacadamente o câncer.



Já foram catalogados mais de 3.000 óleos essenciais e aproximadamente 300 destes tem aplicabilidade na indústria farmacêutica, cosmetologia e nutrição. Muitos destes compostos possuem capacidade citotóxica já descrita envolvendo diversos mecanismos para desencadear a indução de morte celular por ativação de processos de apoptose e/ou necrose, parada do ciclo celular e perda de função das organelas essenciais. Características como o baixo peso molecular dos componentes e natureza lipofílica permitem que os óleos essenciais atravessem as membranas celulares e possibilitem diversas alterações (SHARIFI-RAD *et al*, 2017).

*Virola surinamensis* é uma espécie típica da floresta amazônica, conhecida principalmente como “ucuúba” que na tradição indígena Tupi pode significar “árvore que produz substância gordurosa”; devido ao sebo que pode ser extraído das suas sementes que configura muitas das propriedades medicinais atribuídas a planta (GALUPPO e CARVALHO, 2001). Possui vastas propriedades farmacológicas já relatadas como antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatórias, entre outras (CARVALHO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2008). Pouco se sabe sobre suas propriedades anticâncer, alguns ensaios foram feitos utilizando o extrato de seiva, além das cascas de caule e sua seiva (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; COSTA *et al.*, 2008; BELOZ, 1992). Entretanto, nenhum estudo foi realizado sobre o potencial citotóxico dos óleos essenciais de *V. surinamensis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CÂNCER: ASPECTOS GERAIS

O câncer representa um conjunto de diversas doenças diferentes, de etiologias multifatoriais e caracterizadas pelo crescimento desordenado de células com potencial de invasão para outros órgãos e tecidos (CAO *et al.*, 2011). Destaca-se que os cânceres (ou neoplasias malignas) exibem grande variabilidade biológica inter e intraindividual, dificultando assim a resposta ao tratamento antitumoral (RODRÍGUEZ-ANTONA e TARON, 2015).

Embora apresentem tantas características contrastantes, todos os tipos de câncer possuem características em comum (Figura 1), como imortalidade, produção de fatores de crescimento tumorais, resistência a apoptose, angiogênese, metástase e supressão de fatores de regulação celular (HANAHAN e WEINBERG, 2000; HANAHAN e WEINBERG, 2011; INCA, 2011).



**Figura 1.** Marcadores do câncer (Hallmarks of câncer). Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

Além de possuírem características fenotípicas em comum, durante o processo de formação dessas patologias estão envolvidos diversos fatores ambientais e genéticos, dentre os fatores ambientais: cigarro, incidência de raios UV, alimentação

e infecções virais) e fatores internos a exemplo do sistema imune, hormônios, fatores genéticos e envelhecimento (INCA, 2015; DIAS et al, 2015).

Adicionalmente, as neoplasias malignas podem ser classificadas de acordo com o tipo de célula/tecido responsável pela sua formação em carcinomas, neoplasias derivadas de células epiteliais; sarcomas, neoplasias derivadas de células mesenquimais; leucemias e linfomas, neoplasias derivadas das células hematopoiéticas; e neoplasias derivadas de células do tecido nervoso (ALBERTS *et al.*, 2010).

Sobre o processo de carcinogênese, como relatado, algumas alterações são essenciais neste processo, como mudanças no controle genético da divisão celular que pode gerar em proliferação celular irrestrita. O processo de formação do câncer é heterogêneo para os diferentes tipos de câncer e pode levar décadas até a formação do tumor (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003). Durante o processo de carcinogênese estão envolvidas vias de sinalização como a MAPK e PI3K/Akt, salienta-se que podem ser utilizadas como alvos terapêuticos. Adicionalmente outras vias envolvidas no microambiente tumoral e sinalização, a exemplo da WNT e Hedgehog também podem ser alvos interessantes de estudos farmacológicos (TAKEBE *et al.*, 2011; TAKEBE *et al.*, 2015; SAEZ-RODRIGUEZ, MACNAMARA e COOK, 2015).

Podem ser identificados diferentes estágios durante o processo de carcinogênese, embora alguns tumores não apresentem sua formação neste contexto. A iniciação, primeiro estágio, acredita-se que seja causada por mudanças genéticas irreversíveis. A célula iniciada não é caracterizada por ser uma célula neoplásica, mas uma célula que sofreu mutações e pode progredir para as etapas seguintes de promoção do tumor. A célula pode permanecer latente neste estágio por semanas, meses ou anos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Na etapa seguinte, promoção tumoral, agentes promotores são responsáveis por inibir processos de reparo do DNA e promover a multiplicação celular. No último estágio, progressão tumoral, as células sofrem mudança fenotípica para neoplasia maligna e a proliferação celular ocorre independente de estímulos. Esse estágio caracteriza-se pelo fenótipo adquirido pelas células, mudança irreversível caracterizada pela instabilidade genética, crescimento acelerado, angiogênese

tumoral, invasão, metástase e outras alterações bioquímicas, metabólicas e morfológicas (OLIVEIRA *et al*, 2007).

O estágio em que o câncer se apresenta no momento do diagnóstico influencia significativamente o planejamento do tratamento, bem como o prognóstico da doença. Um diagnóstico em um estágio inicial pode permitir um tratamento menos invasivo e mais eficaz, proporcionando um melhor prognóstico para o paciente (AMBROGGI *et al*, 2015).

## 2.2. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

A alta prevalência de câncer a nível mundial desperta um grande interesse científico para uma melhor compreensão biológica e desenvolvimento de fármacos antitumorais. A doença é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todas as regiões do mundo independente do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) da região, embora o IDH seja um fator importante que influencia na sobrevivência do paciente, nos tipos de câncer mais prevalentes e nos tratamentos disponíveis. A Organização Mundial em Saúde relatou que em 2015 o câncer foi a primeira, segunda ou terceira causa de morte antes dos 70 anos em 113 países dos 172 que fazem parte da organização. Foi estimado 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer para o ano de 2018 a nível mundial (BRAY *et al*, 2018).

Para o Brasil, de acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o triênio 2020-22, foi estimado 625 mil novos casos de câncer a cada ano. A tabela 1 traz a estatística atual para os 10 tipos de câncer mais prevalentes por sexo. O câncer de próstata atualmente poderá atingir 62,95 novos casos a cada 100 mil homens, sendo o câncer de maior prevalência na população masculina no Brasil e o segundo câncer de maior prevalência em homens a nível mundial. Em contrapartida, na população feminina, o câncer de mama possui um risco de atingir 61,61 novos casos a cada 100 mil mulheres sendo o câncer de maior prevalência na população feminina no Brasil e a nível mundial (INCA, 2020).

O câncer de cólon e reto, muitas vezes chamado de colorretal, poderá atingir 19,63 casos novos a cada 100 mil homens e 19,03 para cada 100 mil mulheres no Brasil em 2020. Adicionalmente, a nível mundial, é o terceiro câncer de maior

incidência com um risco de 26,6 novos casos a cada 100 mil pessoas. Apesar da alta incidência, é um câncer tratável e passível de remoção cirúrgica quando descoberto no estágio inicial. Geralmente, origina-se a partir de pólipos que podem surgir na parede interna do intestino grosso (INCA, 2020).

**Tabela 1.** Estimativa dos 10 tipos de cânceres mais incidentes na população brasileira para o ano de 2020

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

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

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Retirado de INCA, 2020.

### 2.3. TRATAMENTO E FARMACOLOGIA DO CÂNCER

Considerando a vasta literatura sobre câncer e os fatores epidemiológicos da doença, várias abordagens foram e continuam sendo propostas para o tratamento dessa doença. O objetivo de qualquer tratamento para o câncer visa remover ou destruir as células cancerígenas sem danificar o tecido normal. Os tratamentos comuns para os diversos tipos de câncer são remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e novas abordagens terapêuticas como imunoterapias e hormonioterapias; as modalidades terapêuticas que podem ser usadas sozinhas ou em combinação entre si ou com outras terapias (Huang *et al*, 2017; INCA, 2011). Adicionalmente, transplantes de medula óssea são realizados em neoplasias de origem hematopoiética, como as leucemias e linfomas (DIAS *et al*, 2015).

A cirurgia compreende um tratamento bastante utilizado, principalmente com relação a tumores sólidos. Na radioterapia é utilizado raios X de alta energia, contudo de forma isolada, apresenta-se como abordagem bastante limitada (HUANG *et al*, 2017). A quimioterapia baseia-se na administração de medicamentos de forma sistêmica em intervalos regulares. Os imunoterápicos baseiam-se no uso de moléculas do sistema imune para o tratamento dos tumores de forma mais seletiva se comparado as abordagens tradicionais, podendo levar ao surgimento de linfócitos de memória contra as neoplasias (GEIGER e RUBNITZ, 2015). A hormonioterapia é um tipo de quimioterapia baseada no uso de substâncias semelhantes a hormônios ou inibidores para o tratamento dos cânceres dependentes desses (INCA, 2011).

Destaca-se a importância da estratégia quimioterápica para a melhora do paciente. Segundo dados da OMS (2020), 47% de toda triagem clínica farmacêutica são de medicamentos para o tratamento de câncer, embora o processo para obtenção de um fármaco leve mais de 10 anos para chegar ao mercado. O desenvolvimento de novos fármacos torna-se complexo pela dificuldade em conseguir fármacos que sejam seletivos para as células cancerosas e pelas características da doença, mutações genéticas, entre outros (MAGALHÃES, FERREIRA e ANDRICOPULO, 2018). Outra questão complexa relacionada aos quimioterápicos, é aquisição de resistência a esses agentes quimioterápicos (DAWOOD *et al.*, 2014)

Como a maioria dos quimioterápicos não são seletivos somente para as células cancerígenas, o sucesso do tratamento é determinado pela sobrevida maior das células saudáveis (SABAS *et al.*, 2012). Em sua maioria, os quimioterápicos em uso, baseiam-se na interferência dos processos celulares, principalmente aqueles relacionados a proliferação desordenada de células. Uma abordagem comum são medicamentos que causam alterações no ciclo celular que levam a apoptose (GOLAN, 2009).

Drogas que utilizam mecanismos que levam a morte celular por apoptose podem ser uma estratégia interessante porque a célula cancerígena possui resistência a morte celular por apoptose, fatores pró apoptóticos são suprimidos nas células cancerígenas. Tratamentos que se baseiam na restauração das vias apoptóticas podem ser promissores em eliminar as células cancerígenas (SADEGHI *et al*, 2019).

Falando especificamente sobre o tratamento para câncer de colón que quando detectado precocemente tem grandes chances de cura quando não ocorreu o processo de metástase (INCA, 2020). O fármaco 5-Fluorouracil (5-FU) é o tratamento de primeira linha recomendado para esta doença em estágio avançado (ARNOLD, *et al*, 2016). Embora destaca-se que também é amplamente utilizado no tratamento de outras neoplasias.

#### 2.4. PRODUTOS NATURAIS

A bioprospecção de produtos naturais e seus derivados para a prática farmacêutica ainda é muito importante na busca de novos fármacos. Produtos naturais são compostos complexos e seu uso na prática clínica pode ser tão eficiente quanto os compostos sintéticos, dessa forma, a busca de novos fármacos de origem natural é uma prática comum nas pesquisas (ATANASOV *et al.*, 2015). Nessa perspectiva, aproximadamente 70% dos fármacos antineoplásicos em uso clínico são produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Os produtos naturais são compostos bioativos produzidos por seres vivos. É a principal fonte de medicamentos para o tratamento de doenças desde a antiguidade. No início do século XIX, começou a comprovação científica desses compostos como futuros medicamentos (CRAGG, GROTHAUS E NEWMAN, 2014).

Muitos derivados de compostos naturais são utilizados atualmente como quimioterápicos para o tratamento de câncer. Os alcaloides de vinca, isolados da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, são utilizados para o tratamento de doença de Hodgkin e leucemias com boas taxas de cura (RIBEIRO *et al.*, 2012). Também já foi relatado que a curcumina (polifenol originado de *Curcuma longa*) possui potencial antiangiogênico e causou indução de apoptose em células HCT 116 (WATSON *et al*, 2008). Deve-se observar que houveram aprovações significativas nos últimos anos em novos compostos para o tratamento de diversos tumores em diferentes países, a exemplo da apilidina, produto natural de origem marinha, recentemente aprovado para tratamento de mieloma múltiplo na Austrália (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Destaca-se que o câncer colorretal é tratado comumente com o medicamento 5-fluoracil. Quando este medicamento apresenta falhas, o segundo medicamento na

linha de tratamento é o irinotecan, um alcaloide isolado de plantas, que causa dano celular e conseqüentemente a morte celular. Entretanto, embora seja amplamente utilizado na clínica por ser um quimioterápico de amplo espectro possui diversos efeitos colaterais como diarreias e neutropenia (HUANG *et al*, 2019).

## 2.5. ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais (OE) são metabólitos secundários de composição diversa, influenciada por fatores ambientais. Podem conter álcoois, terpenos, mono e sesquiterpenos, fenóis, fenilpropanoides, entre outros. São solúveis em solventes orgânicos, lipossolúveis e voláteis. A atividade biológica dependerá de seus constituintes químicos que, por sua vez, depende das variações climáticas, tipos de solo, época de coleta, altitude, metodologia usada para extração, entre outros (FONTES *et al*, 2013; RAULT *et al.*, 2014). Para a espécie vegetal que o originou, apresenta funções como: defesa contra predadores, insetos, herbívoros e infecções bacterianas, e também são utilizados para sinalização entre plantas da mesma espécie (BLOWMAN *et al.*, 2018).

Desde a antiguidade, descobriu-se que os OE também possuem propriedades interessantes que poderiam ser utilizadas em benefício para as pessoas. As atividades farmacológicas incluem propriedades antimicrobianas, citotóxica, antitumoral, antibacteriana, anti-inflamatória, antimutagênica, antifúngica, antioxidante o que desperta grande interesse comercial (RAULT *et al.*, 2014; ALCÂNTARA, 2015).

No Brasil, seu uso comercial originou-se no início do século XX devido a demanda do mercado externo com base no extrativismo de essências nativas (ALCÂNTARA, 2015). Principalmente pela vasta variedade ambiental brasileira com potencial ainda em estudo (BIZZO *et al*, 2009).

Existe uma vasta literatura sobre óleos essenciais e já foram descritos mais de 3.000 óleos essenciais diferentes, sendo que cerca de 300 destes são considerados importantes para indústria farmacêutica, cosmetologia e nutrição. É inegável a capacidade citotóxica destes compostos, o qual diversos mecanismos estão envolvidos para desencadear a indução de morte celular por ativação de processos



de apoptose e/ou necrose, parada do ciclo celular e perda de função das organelas essenciais (SHARIFI-RAD et al, 2017).

Deve-se levar em consideração que as características físicas destes compostos estão relacionadas com sua atividade citotóxica. A natureza lipofílica e o baixo peso molecular dos componentes que compõem os OE permitem que os mesmos atravessem as membranas celulares e possibilitem diversas alterações como mudança da composição da membrana e aumento da fluidez da membrana celular. Além disso, também podem estar relacionados com atividade antioxidante (SHARIFI-RAD et al, 2017).

Nessa perspectiva, a prospecção de novas espécies vegetais e seus metabolitos secundários constitui-se uma ampla área de pesquisa e vem sendo continuamente estudados buscando o desenvolvimento de novos fármacos visando o controle e tratamento de diversas doenças (SIMAS et al., 2004; MIRANDA et al., 2017).

## 2.6. *Virola surinamensis* (ROL.) WARB. (MYRISTICACEAE)

*V. surinamensis* (Figura 2) é uma árvore típica da floresta amazônica, recorrente em regiões de várzeas (igapós). Sua exploração comercial ocorre em larga escala desde a década de 1980 para o uso de sua madeira o que tornou a planta em ameaça de extinção ainda no século XX. Possui diversos nomes populares como “hiboucauhu”, “bicuda” e “ucuúba”. Na língua tupi, ucuúba pode significar “árvore que produz substância gordurosa”; devido ao sebo que pode ser extraído das suas sementes que configura muitas das propriedades atribuídas a planta (GALUPPO e CARVALHO, 2001). Sua constituição é de árvore lenhosa podendo chegar até 40 metros de altura e sua distribuição no Brasil vai desde os estados do Amazonas até Goiás (OLIVEIRA, 2018; RODRIGUES, 1980).

**TAXONOMIA:**

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Magnoliales

Família: Myristicaceae

Gênero: *Virola*Espécie: *Virola surinamensis* (Rol) Warb.

**Figura 2.** Dados taxonômicos da *Virola surinamensis* e imagens de folha e casca da planta Adaptado de GALUPPO e CARVALHO, 2001.

Além da importância para a indústria madeireira, é bastante utilizada por povos indígenas devido as suas propriedades como auxílio no tratamento de reumatismo, cólicas, dispepsias e erisipelas, entre outros. (GALUPPO e CARVALHO, 2001). A tabela 2 resume os principais usos encontrados nas referências sobre a espécie.

Essa variedade de usos medicinais populares para *V. surinamensis* levou a alguns estudos etnofarmacológicos anteriores com esta planta medicinal, nos quais algumas propriedades farmacológicas foram relatadas por seus extratos/óleos essenciais ou metabólitos secundários, incluindo anti-esquistossomático (BARATA *et al.*, 1978), triponossomicida (LOPES *et al.*, 1998), antimalárico (LOPES *et al.*, 1999), antileishmanial (BARATA *et al.*, 2000; VEIGA *et al.*, 2017), antifúngico (COSTA *et al.*, 2008), antibacteriano (COSTA *et al.*, 2008), atividades antiulcerogênicas (HIRUMALIMA *et al.*, 2009), antinociceptivas (CARVALHO *et al.*, 2010) e anti-inflamatórias (CARVALHO *et al.*, 2010). Sabe-se que as atividades medicinais provenientes da *V. surinamensis* podem estar relacionadas à presença de compostos bioativos que já foram extraídos da planta como lignanas, neolignanas, propilfenonas, arilpropanóides e flavonoides (OLIVEIRA, 2018).

**Tabela 2.** Principais usos em suas diferentes formas da *Virola surinamensis* encontrados nas referências bibliográficas

Formas de uso	Tratamento	Referência
Óleo das sementes e uso da resina	Dores reumáticas, parasitas intestinais, asma brônquica, halitose, doenças de pele, hemorroidas, feridas crônicas, leucorreia, hemoptise e diarreia	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2016)
Chá com as folhas e resina da casca	Cólica, dispepsia, erisipelas e processos inflamatórios	(SCHULTES e HOLMSTED, 1971; CORREA, 1984; LORENZI e MATOS, 2002; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002)
Decocção de cascas e frutas	Furunculose e infecções intestinais (topicamente)	(SARQUIS <i>et al.</i> , 2019)
Vapor das folhas	Malária (inalação)	(LOPES <i>et al.</i> , 1999)
Látex com água	Doenças venéreas (topicamente)	(Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002; COSTA <i>et al.</i> , 2008)
Cascas de caule e seiva	Inflamação, infecções, gastrite, úlceras e câncer	(DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; COSTA <i>et al.</i> , 2008)
Extrato hexânico	Atividade contra promastigotas de <i>Leshmania chagasi</i> e <i>L. amazonenses</i>	(VEIGA <i>et al.</i> , 2017)
Óleos essenciais de folha e casca	Atividade fungicida frente à <i>Candida albicans</i>	(LIMA, 2018)
Extrato de seiva	Atividade em ensaio citotóxico de camarão de salmoura	(BELOZ, 1992)

Nota: Dados organizados pelo autor.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antineoplásico de óleos essenciais das cascas (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o potencial citotóxico dos óleos essenciais de *Virola surinamensis* frente diferentes linhagens de células cancerígenas e não cancerígena;
- Analisar os efeitos dos óleos essenciais de *Virola surinamensis* sobre a viabilidade celular, ciclo celular, externalização da fosfatidilserina e potencial transmembrânico mitocondrial;
- Avaliar a morfologia celular após o tratamento com os óleos essenciais;
- Avaliar o efeito antitumoral *in vivo* dos óleos essenciais em modelo de xenotransplante.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. OBTENÇÃO DA PLANTA *Virola surinamensis*

As folhas e casca de *V. surinamensis* foram coletadas (material seco e infértil) e identificadas pelo Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen em fazenda privada no município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas, Brasil em dezembro de 2014. O Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) confirmou a autenticidade do material em comparação com um voucher previamente depositado (# 244270).

O material coletado foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) através do número: AED7F3A.

### 4.2. OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A obtenção e caracterização dos óleos essenciais de folhas e casca (OEF e OEC) foi realizado pela equipe do Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen na Universidade Estadual do Amazonas (UEA). O OE foi obtido através da hidrodestilação, experimento realizado em triplicata utilizando aparelho do tipo Clevenger (Diogolab, Poá, Brazil). Foram utilizados 1,2 kg de casca triturada e 900 g de folhas por um período de 4 h em 4 L de água ultrapura (18,2 M $\Omega$ ) cada. Além disso, os óleos essenciais obtidos foram extraídos três vezes com clorofórmio, secos sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrados através de uma membrana de nylon (tamanho de poro 0,22  $\mu$ m, Whatman, Maidstone, Reino Unido).

### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A composição química dos óleos essenciais foi obtida por cromatografia gasosa acoplada à análise por espectrometria de massa (CG-MS) com um dispositivo GCMS/QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar Rtx-5 MS (30 mx 0,25 mm x 0,25, Restek). Foi utilizado hélio a uma taxa de fluxo de 1,02 mL/min como veículo, e as injeções de 1  $\mu$ L foram realizadas com soluções estoque

de 1,0 mg/mL em clorofórmio com uma razão de partição de 1:50 para OEC e OEF. O programa de temperatura da coluna foi de 55 a 285 °C com aumentos graduais de 3 ° C/min. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram de 215 °C e 265 °C, respectivamente.

A identificação dos picos foi baseada em comparação com aqueles armazenados na biblioteca da 8ª edição do Wiley (picos com semelhança <90% foram desconsiderados), confirmado calculando os índices de retenção (IR) de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963) em comparação com uma série homóloga composta por 8 hidrocarbonetos lineares que variam de n-C7 a n-C30.

Uma análise semi-quantitativa foi realizada para obter a quantidade relativa de cada componente de OEC e OEF. Para isso, foi aplicada cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (CG-DIC). Um sistema consistindo de equipamento GC2010 (Shimadzu) equipado com uma coluna capilar Rtx-5 foi usado nas mesmas condições que a análise GC-MS. Quantidades relativas (%) foram calculadas em relação à área total do cromatograma de três repetições independentes.

#### 4.4. ENSAIOS IN VITRO

##### 4.4.1. *Obtenção e manutenção das células em cultura*

As linhagens celulares tumorais e não tumorais, utilizadas neste estudo, foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection - Rockville, Maryland, U.S.A.). As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA) e 10 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e foram acompanhadas diariamente com o auxílio de microscópio óptico invertido. Para a manutenção das linhagens de células aderentes, foi utilizada uma solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) para separar as células das garrafas de cultura.

Todos os experimentos foram conduzidos com células em fase exponencial de crescimento e em triplicata. Foi realizado teste para micoplasma usando kit de detecção de micoplasma por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e foram consideradas livres de contaminação.

A tabela 3 apresenta o tipo histológico e origem das linhagens celulares utilizadas para o Ensaio do Alamar Blue (Análise da Citotoxicidade). Após a determinação da  $CI_{50}$  dos óleos essenciais de *Virola surinamensis*, a linhagem de células de carcinoma de cólon (HCT116) foi selecionada para realização dos experimentos posteriores.

**Tabela 3.** Linhagens celulares utilizadas para avaliação da citotoxicidade pelo método de Alamar Blue

<b>Linhagem</b>	<b>Tipo histológico</b>	<b>Origem</b>
MCF-7	Carcinoma de mama	Humana
HCT116	Carcinoma de cólon	Humana
HepG2	Carcinoma hepatocelular	Humana
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana
B16-F10	Melanoma	Camundongo
MRC-5	Fibroblasto de pulmão	Humana

#### 4.4.2. Avaliação da Citotoxicidade – Método de Alamar Blue

Para avaliar a citotoxicidade foi realizado o ensaio de Alamar Blue, que se baseia no uso da resazurina (Alamar Blue) como indicador fluorescente com propriedades de oxido-redução. A resazurina em células viáveis sofre redução tornando-se resorufina que possui a coloração rósea, porém, em células não viáveis, a resazurina não sofre reação, permanece oxidada com coloração azul (AHMED *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

As células foram diluídas, para uma densidade de  $0,7 \times 10^5$  células/mL para células aderentes ou  $0,3 \times 10^6$  células/mL para células em suspensão, e depois foram

semeadas em placas de 96 poços. Após 24 h, os óleos essenciais, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil), foram adicionados a cada poço. A doxorubicina (DOX, pureza  $\geq 95\%$ , cloridrato de doxorubicina, IMA Laboratório S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) e o 5-fluorouracil (5-FU, pureza  $> 99\%$ ; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foram utilizados como controles positivos desse ensaio e suas concentrações variaram de 0,04 a 5  $\mu\text{g/mL}$  e 0,2 a 25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, são pró-fármacos, medicamentos já utilizados na prática clínica para o tratamento de diversos tipos de cânceres. O DMSO 0,5%, veículo utilizado para a diluição dos óleos essenciais, foi usado como controle negativo. Os óleos essenciais e controles positivos e negativos foram incubados durante 72 h. Quatro horas antes do final da incubação foram adicionados a cada poço 20  $\mu\text{L}$  de resazurina (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA). A absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm utilizando espectrofotômetro SpectraMax 190 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), quantificando o efeito das amostras testes (AHMED *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

Os valores da concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram obtidos por regressão não linear. O índice de seletividade (IS) foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$IS = CI_{50} (\text{células não cancerígenas}) / CI_{50} (\text{células cancerígenas}).$$

#### 4.4.3. Ensaio da Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripam

O ensaio de exclusão por azul de tripam foi realizado em células HCT116 para confirmação do potencial citotóxico dos óleos essenciais sobre a viabilidade celular. Este ensaio permite diferenciar as células viáveis das células não viáveis através da coloração pelo azul de tripam. O corante se fixa nas células não viáveis (resultando em uma coloração azulada), enquanto as células viáveis o expulsam, permitindo a avaliação da integridade da membrana plasmática.

As células HCT116 foram plaqueadas na densidade de  $0,7 \times 10^5$  em placa de 24 poços e incubadas durante 24 e 48 h com os óleos essenciais e controles. As concentrações escolhidas dos OE foram de 5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$  com base nos resultados da  $CI_{50}$ . Foram retirados 90  $\mu\text{L}$  de células HCT116 e adicionados 10  $\mu\text{L}$  de azul de



tripam, em seguida foi colocado em câmara de Neubauer para contagem das células em microscópio óptico (Olympus BX41, Tóquio, Japão).

#### *4.4.4. Determinação do Ciclo Celular e Fragmentação do DNA*

Este experimento se baseia em avaliar o resultado da distribuição do conteúdo de DNA nuclear da população de células analisadas e assim determinar os efeitos dos OE nas fases do ciclo celular, podendo determinar em que fase do ciclo celular os compostos testados induziram parada.

As células apresentam diferentes conteúdos de DNA a depender da fase em que se encontra. O período de crescimento celular constitui a fase G<sub>1</sub>, uma célula diplóide apresenta duas cópias de cada gene de DNA nuclear (2C), na fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear (2-4C) e na fase seguinte, fase G<sub>2</sub>, ocorre o segundo período de crescimento celular, o conteúdo em DNA nuclear é mantido em 4C. Na mitose, fase M (4C), a célula se divide, formando duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C de DNA. E as células que não se encontram em divisão celular (G<sub>0</sub>) apresentam um conteúdo 2C de DNA. Portanto, o resultado da distribuição do conteúdo de DNA nuclear de uma população de células é apresentado da seguinte forma: G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M.

Para este fim utiliza-se Iodeto de propídio (PI), permeabilizante nuclear, e corante nucleofílico. As células com o núcleo condensado e DNA fragmentado (indicando apoptose) incorporam menos PI e conseqüentemente emitindo menor fluorescência que será detectada por citometria de fluxo.

As células HCT116 foram plaqueadas na densidade de  $0,7 \times 10^5$  em placas de 24 poços com diferentes concentrações dos óleos essenciais (5, 10 e 20 mg/mL) e incubadas por 24 e 48 h. As concentrações utilizadas em ambos os OE foram 5, 10 e 20 µg/mL. As células foram diluídas com a solução de permeabilização (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100, 2 µg/mL iodeto de propídio e 5 mg de RNase em PBS), e incubadas na ausência de luz a 37 °C, e, após 30 minutos, analisadas por citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR,

EUA). Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

#### 4.4.5. Determinação da Externalização da Fosfatidilserina

A ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina indica processo de morte celular por apoptose e a ligação do Iodeto de Propídio (IP) ao DNA de células que apresentam dano na membrana, indicativo de lesão celular ou morte celular por necrose. As células em processo apoptótico externalizam a fosfatidilserina, classe de fosfolípídeos presentes em células eucarióticas, que em condições normais localiza-se na superfície interna das membranas plasmáticas. Como consequência de uma morte celular por apoptose esse fosfolípídeo é liberado e pode ser quantificado (MARTIN *et al.*, 1996; NAITO *et al.*, 1997).

Para este experimento, células HCT116 foram plaqueadas na densidade de  $0,7 \times 10^5$  e tratadas com os OE, controle positivo (DOX) e negativo (DMSO) por 24 e 48 h. As concentrações utilizadas em ambos os OE foram 5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente as células foram centrifugadas, lavadas com salina, o sobrenadante descartado e ao *pellet* celular será adicionado 400  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação e acrescentados 5  $\mu\text{L}$  de anexina V-FITC e 5  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídio (Detection Kit I: BD Biosciences, San Jose, CA, USA). As células foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min, e posteriormente analisadas por citômetro de fluxo, conforme descrito anteriormente.

#### 4.4.6. Determinação da Despolarização Mitocondrial

O objetivo deste ensaio é avaliar as alterações causadas pelos OE no potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo, utilizando o corante fluorescente nucleofílico rodamina 123. Quando o potencial transmembrânico encontra-se inalterado, a rodamina 123 é sequestrada para dentro da mitocôndria. Células viáveis possuem uma maior incorporação da rodamina devido a ligação às cargas negativas internas, emitindo assim maior fluorescência verde, enquanto as

células apoptóticas emitem uma menor fluorescência por ter menos afinidade ao corante (MESQUITA, 2010).

As células HCT116 foram plaqueadas na densidade de  $0,7 \times 10^5$  como descrito anteriormente nas diferentes concentrações do óleo essencial, controle positivo e controle negativo. As concentrações utilizadas em ambos os OE foram 5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ . As células foram diluídas com a solução de rodamina 123 (5  $\mu\text{g/mL}$ , Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) e incubadas por 15 minutos na ausência de luz a 37 °C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspensionado em salina, reincubado por 30 minutos e, então, analisadas por citômetro de fluxo, conforme descrito anteriormente.

#### *4.4.7. Análise morfológica – Coloração diferencial May-Grunwald-Giemsa*

Para avaliação das alterações morfológicas causadas pelos óleos essenciais nas células cancerígenas, foi realizado o ensaio de análise morfológica pelo método de coloração diferencial May–Grunwald–Giemsa. A coloração utilizada nesse experimento permite distinguir o citoplasma (cora-se de rosa) e o núcleo (cora-se de azul), sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma e membrana celular. As células HCT116 foram plaqueadas na densidade de  $0,7 \times 10^5$  e incubadas com os OE, controle positivo, controle negativo e sem tratamento nos tempos de 24 e 48 horas. As concentrações utilizadas em ambos os OE foram 5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ . Após o período de incubação, as células fixadas em lamínulas foram coradas, cuidadosamente retiradas e fixadas, as alterações morfológicas analisadas pelo microscópio óptico (OlympusBX41, Tóquio, Japão) e fotografadas utilizando o software ImagemPro (Media Cybernetics, MD, EUA) com objetiva de aumento de 100x.

## 4.5. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

### 4.5.1. *Delineamento do Ensaio in vivo*

Para avaliação do efeito antitumoral do OE, 40 camundongos C.B-17 SCID (fêmeas, 25 a 30 g) foram obtidos e mantidos no Biotério das instalações do Instituto Gonçalo Moniz-FIOCRUZ (Salvador, Bahia, Brasil). Os camundongos foram alojados em gaiolas com livre acesso a comida e água e foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12h (luzes acesas às 6h). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IGM (protocolo experimental aprovado pelo número 06/06/2015 - CEUA 006/2015).

As células HCT116 ( $10^7$  células por 500  $\mu$ L) foram implantadas por via subcutânea nas axilas frontais esquerdas dos animais conforme protocolo já previamente estabelecido (BALIZA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: (G1) os animais foram tratados com um veículo (DMSO 5%, n = 10); (G2) os animais foram tratados com 5-fluorouracil (10 mg/kg, n = 10); (G3) os animais foram tratados com OEC (40 mg/kg, n = 10); e (G4) os animais foram tratados com OEF (40 mg/kg, n = 10), concentrações escolhidas com base em dados da literatura. Começando um dia após a implantação do tumor, os camundongos foram tratados por via intraperitoneal por 15 dias consecutivos. Um dia após o término do tratamento, os animais foram anestesiados (50 mg/kg de tiopental) e amostras de sangue periférico foram coletadas da artéria braquial para análises hematológicas e os tumores e órgãos (rins, pulmão, fígado e coração) foram excisados e pesados. O efeito do tratamento foi expresso como a porcentagem de inibição do controle. Além disso, as características histológicas dos tumores e as diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas por microscopia óptica por um patologista experiente.

### 4.5.2. *Avaliação do perfil hematológico, morfológico e tecidual*

Inicialmente foi feita a avaliação do efeito dos OE sobre o peso dos animais, os camundongos foram pesados no início e ao término do tratamento. Foi realizado constante monitoramento dos animais para analisar caso houvesse o surgimento de anomalias e comportamentos estranhos. Após a eutanásia dos animais, o sangue e

órgãos (rins, pulmão, fígado e coração) foram coletados. As análises hematológicas foram realizadas no equipamento Advia 60 hematology system (Bayer, Leverkusen, Alemanha). Os parâmetros analisados foram: eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), plaquetas, leucócitos, leucócitos diferenciados, granulócitos, linfócitos e monócitos

Os órgãos foram pesados e analisados através de observação de possíveis sinais de lesões graves ou demais variações. Os órgãos foram fixados em solução de formol a 4%, posteriormente, a macroscopia foi realizada e os fragmentos corados com hematoxilina e eosina, de acordo com o protocolo de processamento histológico da Histotecnologia (IGM, Fiocruz, Bahia). A análise histológica dos órgãos foi realizada da microscopia de luz por um patologista.

#### 4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram compilados no programa GraphPad Prism versão 6.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Os dados foram analisados segundo a distribuição na curva normal de Gauss. Os valores de  $CI_{50}$  e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram obtidos através de regressão não linear, a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata. A diferença entre os grupos experimentais foi avaliada por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni, os dados apresentam as medias  $\pm$  o erro padrão (E.P.M/S.E.M.). A análise estatística deste estudo considerou como nível de significância o valor de “p” correspondente a alfa ( $\alpha$ ) menor ou igual a 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A hidrodestilação das cascas e folhas de *V. surinamensis* resultou em dois óleos essenciais de coloração esverdeada e aroma agradável, e as análises por CG-MS e CG-FID levaram a detecção de 19 picos detectados e identificados OEC e 39 picos detectados e identificados, conforme descrito na Tabela 4. As recuperações dos óleos foram de  $1,21 \pm 0,10\%$  (p/p) para OEC e  $1,78 \pm 0,17\%$  para OEF, nas quais foi observada uma composição predominante de sesquiterpenos (> 90%) para ambas as amostras.

Os constituintes principais encontrados no OEC foram aristoleno ( $28,4 \pm 5,03\%$ ),  $\alpha$ -gurjuneno ( $15,0 \pm 3,17$ ), valenceno ( $14,1 \pm 4,87$ ), germacreno D ( $7,58 \pm 2,15$ ),  $\delta$ -guaiano ( $6,86 \pm 2,40$ ) e  $\alpha$ -guaiano ( $5,18 \pm 0,87$ ). Os constituintes principais encontrados no OEF foram  $\alpha$ -farnenseno ( $14,5 \pm 3,24$ ),  $\beta$ -elemeno ( $9,61 \pm 1,02$ ), biciclogermacreno ( $8,10 \pm 2,42$ ), germacreno D ( $7,44 \pm 1,80$ ),  $\alpha$ -cubebeno ( $5,69 \pm 0,67$ ),  $\alpha$ -copaeno ( $5,02 \pm 0,77$ ) e elemicina ( $4,80 \pm 1,13$ ).

**Tabela 4.** Composição química do óleo essencial de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis*

Compostos	Peso molecular	IR <sup>a</sup>	OEC (%) <sup>b</sup>	OEF (%) <sup>b</sup>
$\alpha$ -tujeno	136	923	$0,33 \pm 0,03$	-
artemisia triene	136	925	$1,05 \pm 0,22$	-
$\alpha$ - pineno	136	933	-	$1,28 \pm 0,31$
$\beta$ -pineno	136	964	-	$0,60 \pm 0,10$
Mirceno	136	991	-	$0,11 \pm 0,02$
Limoneno	136	1031	$0,34 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,25$
Terpinoleno	136	1086	$0,59 \pm 0,08$	$0,88 \pm 0,11$
$\alpha$ -cubebeno	204	1345	$4,47 \pm 0,52$	$5,69 \pm 0,67$

$\beta$ -elemeno	204	1375	5,42 $\pm$ 0,55	9,61 $\pm$ 1,02
$\alpha$ -copaeno	204	1376	2,30 $\pm$ 0,45	5,02 $\pm$ 0,77
Metil eugenol	178	1401	-	0,48 $\pm$ 0,02
$\alpha$ -gurjuneno	204	1407	15,0 $\pm$ 3,17	-
Aristoleno	204	1416	28,4 $\pm$ 5,03	-
$\beta$ -cariofileno	204	1418	1,94 $\pm$ 0,32	1,70 $\pm$ 0,23
$\beta$ -cedreno	204	1418	-	0,65 $\pm$ 0,09
$\gamma$ -elemeno	204	1430	-	2,72 $\pm$ 0,40
Trans $\alpha$ -bergamoteno	204	1435	-	0,35 $\pm$ 0,01
$\alpha$ -guaieno	204	1439	5,18 $\pm$ 0,87	-
$\alpha$ -humuleno	204	1452	-	0,95 $\pm$ 0,08
Aloaromandredeno	204	1461	-	1,41 $\pm$ 0,12
$\gamma$ -muuroleno	204	1477	-	1,20 $\pm$ 0,16
$\alpha$ -muuroleno	204	1480	-	0,56 $\pm$ 0,10
Germacreno D	204	1480	7,58 $\pm$ 2,15	7,44 $\pm$ 1,80
$\alpha$ -amorfenno	204	1485	-	1,70 $\pm$ 0,88
Valenceno	204	1491	14,1 $\pm$ 4,87	-
Biciclogermacreno	204	1494	-	8,10 $\pm$ 2,42
Ledene	204	1496	-	1,16 $\pm$ 0,10
$\alpha$ - muuroleno	204	1499	-	1,90 $\pm$ 0,25
$\alpha$ -farnenseno	204	1508	-	14,5 $\pm$ 3,24
$\delta$ -guaieno	204	1509	6,86 $\pm$ 2,40	1,80 $\pm$ 0,30
$\gamma$ -cadineno	204	1512	-	0,30 $\pm$ 0,04
Elemicina	208	1540	-	4,80 $\pm$ 1,13
Elemol	222	1547	-	0,44 $\pm$ 0,08
Germacreno B	204	1560	-	0,94 $\pm$ 0,08
Espatuleno	220	1575	2,61 $\pm$ 0,78	3,05 $\pm$ 0,49

Óxido de cariofileno	222	1581	0,80 ± 0,45	2,57 ± 0,50
Viridiflorol	220	1590	-	1,88 ± 0,52
Δ-cadinol	222	1636	-	2,33 ± 0,84
α-cadinol	222	1653	-	2,72 ± 0,66
Cembreno A	276	1942	1,70 ± 0,94	-
<hr/>				
$\Sigma$ hidrocarbonos monoterpenos			2,31	3,95
$\Sigma$ hidrocarbonos sesquiterpenos			91,25	67,70
$\Sigma$ sesquiterpenos oxigenados			3,41	12,99
$\Sigma$ hidrocarbonos diterpenos			1,70	-
$\Sigma$ fenilpropanoides			-	5,28
$\Sigma$ total identificado			98,67	90,21
<hr/>				

<sup>a</sup>Índices de retenção experimental de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz.

<sup>b</sup>Porcentagem relativa

## 5.2. ENSAIOS *IN VITRO*

### 5.2.1. Efeito dos óleos essenciais de casca e folhas de *Virola surinamensis* sobre a viabilidade de células cancerígenas

A citotoxicidade dos óleos essenciais de cascas e folhas de *V. surinamensis* foi avaliada em diferentes linhagens cancerígenas utilizando o ensaio de Alamar blue, após 72 h de incubação. A tabela 5 mostra os valores de  $CI_{50}$  obtidos e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%). OEC apresentou valores de  $CI_{50}$  para células cancerígenas variando de 9,41 a 29,52  $\mu\text{g/mL}$  para HCT116 e B16-F10, enquanto OEF apresentou valores de  $CI_{50}$  para células cancerígenas variando de 7,07 a 26,70  $\mu\text{g/mL}$  para HepG2 e HCT116, respectivamente.



**Tabela 5.** Valores de  $CI_{50}$ , citotoxicidade dos óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis*

Células	$CI_{50}$ e 95%IC em $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )			
	DOX	5-FU	OEC	OEF
<b>Células cancerígenas</b>				
<b>HCT116</b>	0,13 (0,24)	0,61 (4,69)	9,41	26,70
	0,08 – 0,21	0,33 - 1,10	5,63 – 15,75	12,92 – 36,93
<b>HepG2</b>	0,03 (0,06)	0,43 (3,31)	16,93	7,07
	0,01 – 0,19	0,21 - 0,57	8,69 – 32,99	1,55 – 32,22
<b>HL-60</b>	0,04 (0,07)	1,93 (14,84)	20,64	22,76
	0,02 – 0,08	1,32 – 2,38	16,00 – 26,63	17,77 – 29,15
<b>B16-F10</b>	0,20 (0,37)	0,68 (5,23)	29,52	18,80
	0,17 – 0,23	0,33 - 0,92	21,59 – 40,37	11,46 – 30,83
<b>MCF-7</b>	0,28 (0,52)	1,69 (12,99)	15,88	21,39
	0,20 – 0,39	0,72 – 2,34	11,89 – 21,20	8,91 – 51,36
<b>Célula não cancerígena</b>				
<b>MRC-5</b>	3,32 (6,11)	6,74 (51,82)	34,07	38,93
	1,82 – 6,03	5,22 – 9,04	29,54 – 39,30	34,04 – 44,51

Os dados apresentam valores de  $CI_{50}$  em  $\mu\text{g/mL}$  ( $\mu\text{M}$ ) com seus respectivos 95% de intervalo de confiança (IC) obtido por regressão não linear com 3 experimentos independentes em duplicata, mensurados por Ensaio de Alamar Blue após 72 h de tratamento. Células cancerígenas: HCT116 (carcinoma de cólon humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); HL-60 (leucemia promielocítica humano); MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano); e B16-F10 (melanoma murino). Célula não cancerígena: MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano). Controles positivo: Doxorubicina (DOX) e 5-fluorouracil (5-FU).

A tabela 6 representa o Índice de Seletividade (IS) calculado com base nos valores de  $CI_{50}$  da célula não-cancerígena MRC-5 sobre os valores encontrados nas

células cancerígenas tanto para os controles quanto para os OE estudados. Foram encontrados IS variando da HCT116: 25,5 (DOX) e 1,5 (OEF) e da MCF-7: 11,9 (DOX) e 1,8 (OEF).

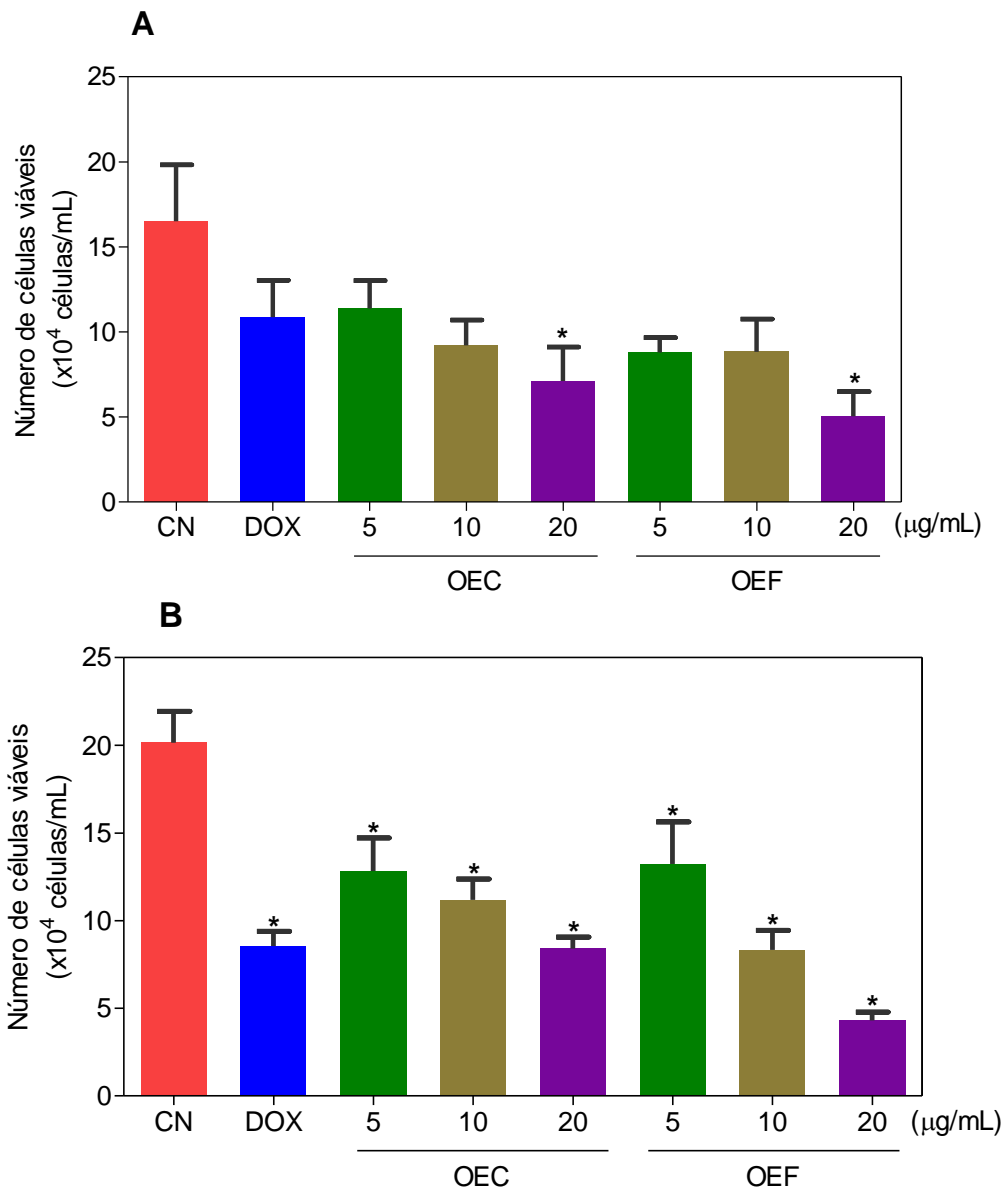
**Tabela 6.** Índice de seletividade do óleo essência de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis*

Fármacos	Índice de seletividade por linhagem celular				
	HCT116	HepG2	HL-60	B16-F10	MCF-7
DOX	25,5	110,7	83,0	16,6	11,9
5-FU	11,5	15,7	3,5	9,9	4,0
OEC	3,6	2,0	1,7	1,2	2,2
OEF	1,5	5,5	1,7	2,1	1,8

Os dados representam o Índice de Seletividade (IS) calculado usando a fórmula:  $IS = CI_{50}[\text{célula não cancerígena}] / CI_{50}[\text{célula cancerígena}]$ . Doxorubicina (DOX) e 5-fluorouracil (5-FU) foram usados como controle positivo.

Observa-se que a DOX e o 5-FU apresentaram IS maiores quando comparado aos OE analisados, contudo é importante salientar que OE são produtos naturais compostos por diversos constituintes que se isolados podem ter resultados benéficos mais interessantes; soma-se a este resultado a necessidade de novas terapêuticas, pois os efeitos colaterais das drogas, DOX e 5-FU, são bastantes significativos e prejudiciais aos pacientes. Os estudos in vivo toxicológicos devem ser analisados de forma a corroborar com estes resultados.

A viabilidade celular também foi avaliada utilizando o ensaio de exclusão com azul de tripam (Figura 3). Os resultados apresentados demonstram que a concentração de 20 µg/mL tanto para OEC e OEF reduziram significativamente a viabilidade celular em 24 h. Contudo, todas as concentrações de ambos OE foram eficientes em reduzir a viabilidade celular em 48 h de tratamento. A doxorubicina, na concentração de 0,5 µg/mL, reduziu o número de células viáveis em ambos os tempos, sendo mais efetivo após 48 h de tratamento.

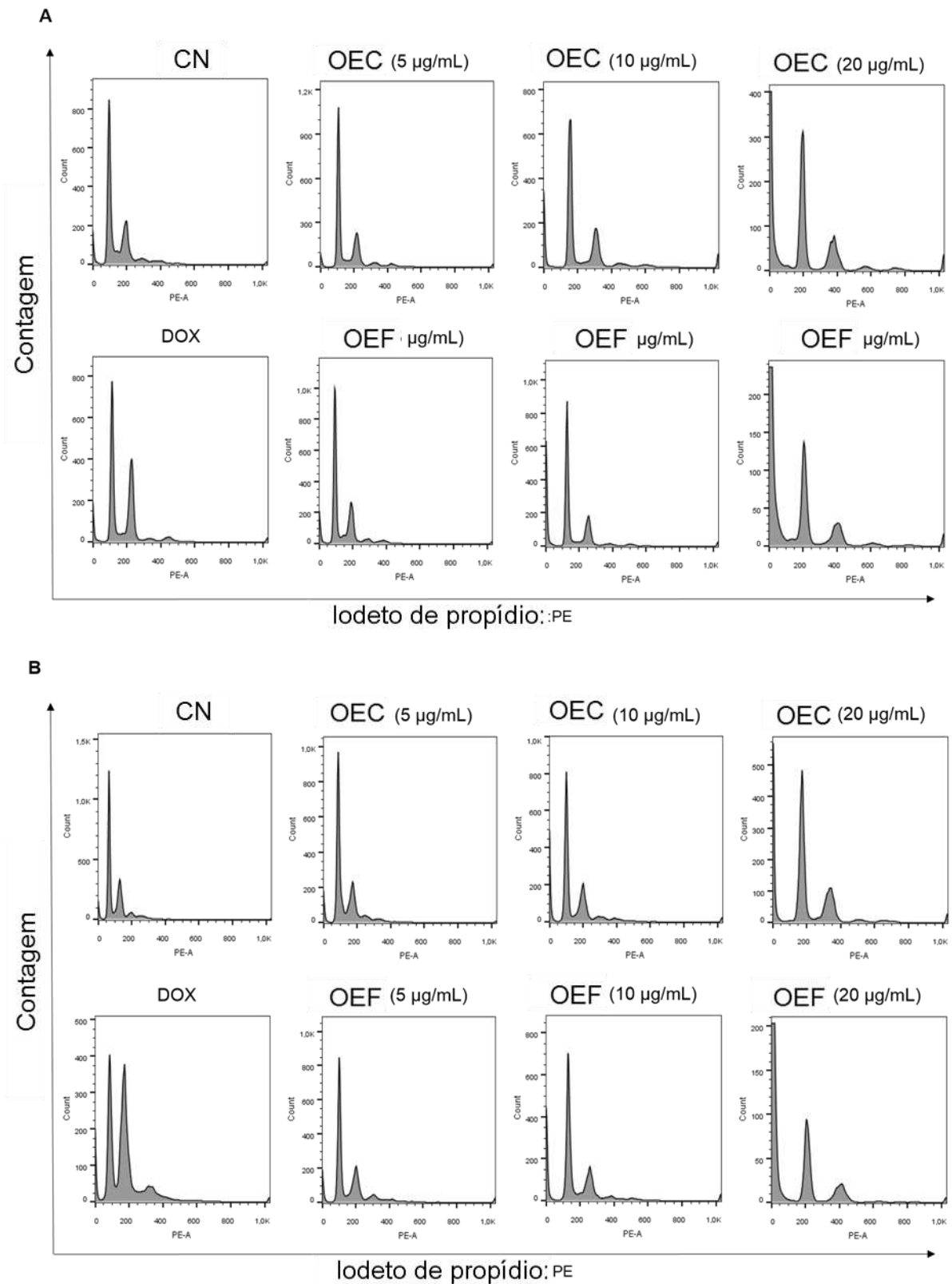


**Figura 3.** Efeito dos óleos essenciais de casca e folhas (OEC e OEF, respectivamente) de *Viola surinamensis* na viabilidade celular de células HCT 116 através de experimento com azul de tripam, após 24h (A) e 48h (B) de tratamento. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo de diluição dos OE, o DMSO, e doxorubicina (DOX, 0.5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Os dados apresentam as medias ± S.E.M. em três experimentos independentes com duplicata. \*  $p < 0.05$  comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido de análise múltipla Bonferroni.

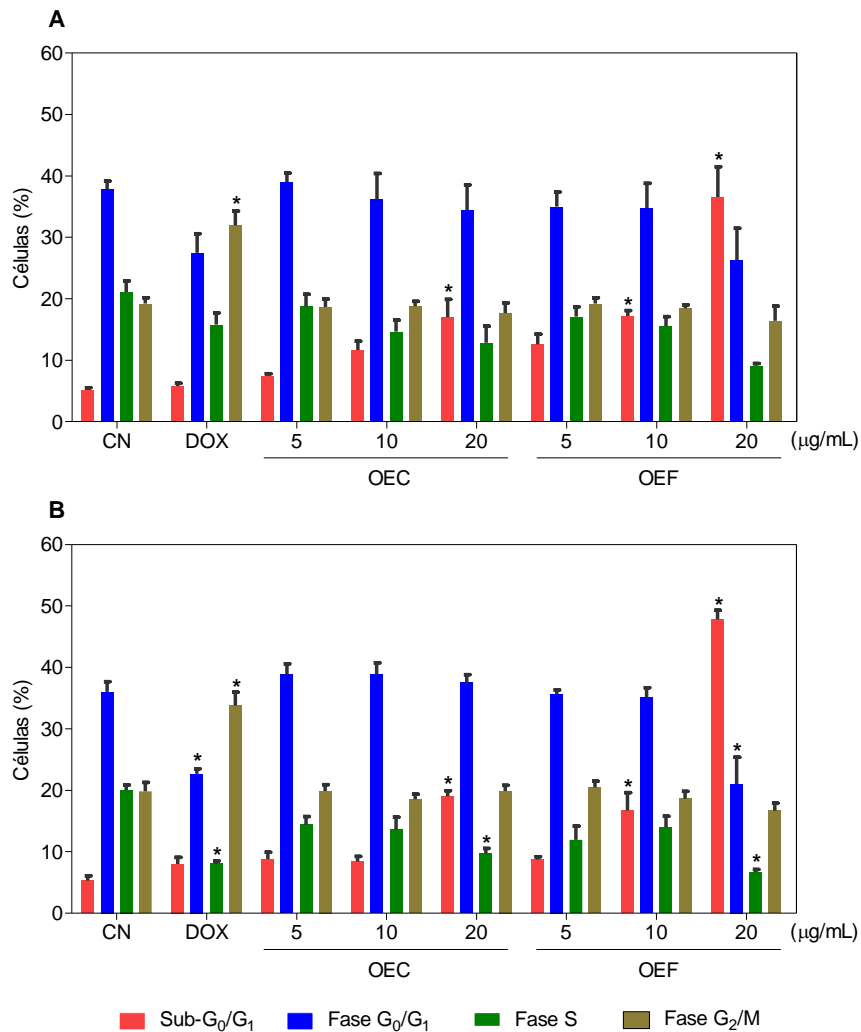
### 5.2.2. Efeito dos óleos essenciais de casca e folhas de *V. surinamensis* sobre o Ciclo Celular

É possível inferir a fase do ciclo celular em que as células se encontram através do conteúdo de DNA, determinando assim se compostos interferem na progressão do ciclo celular (PINTO, *et al.*, 2017). A Figura 4 apresenta os histogramas obtidos por citometria de fluxo na análise do ciclo celular. Já a Figura 5 traz os resultados da análise do ciclo celular e fragmentação do DNA de células HCT116 após tratamento com os óleos essenciais (OEC e OEF) de *V. surinamensis* após os períodos de 24 e 48 h.

Os resultados indicam a ocorrência de aumento da fração sub-G<sub>1</sub> para o OEF tanto em 24 h quanto em 48 h, indicando fragmentação do DNA. Os tratamentos com OEC e OEF induziram um aumento significativo de células com fragmentação do DNA ( $p < 0,05$ ). A doxorubicina também causou significativamente a fragmentação do DNA internucleossômico ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Histogramas representativos da distribuição do ciclo celular de células HCT116 tratadas com óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* após 24 (A) e 48 (B) h de tratamento. O controle negativo (CN) foi tratado com um veículo (DMSO a 0,5 %) usado para diluir OEC e OEF, e a doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) foi usada como controle positivo.

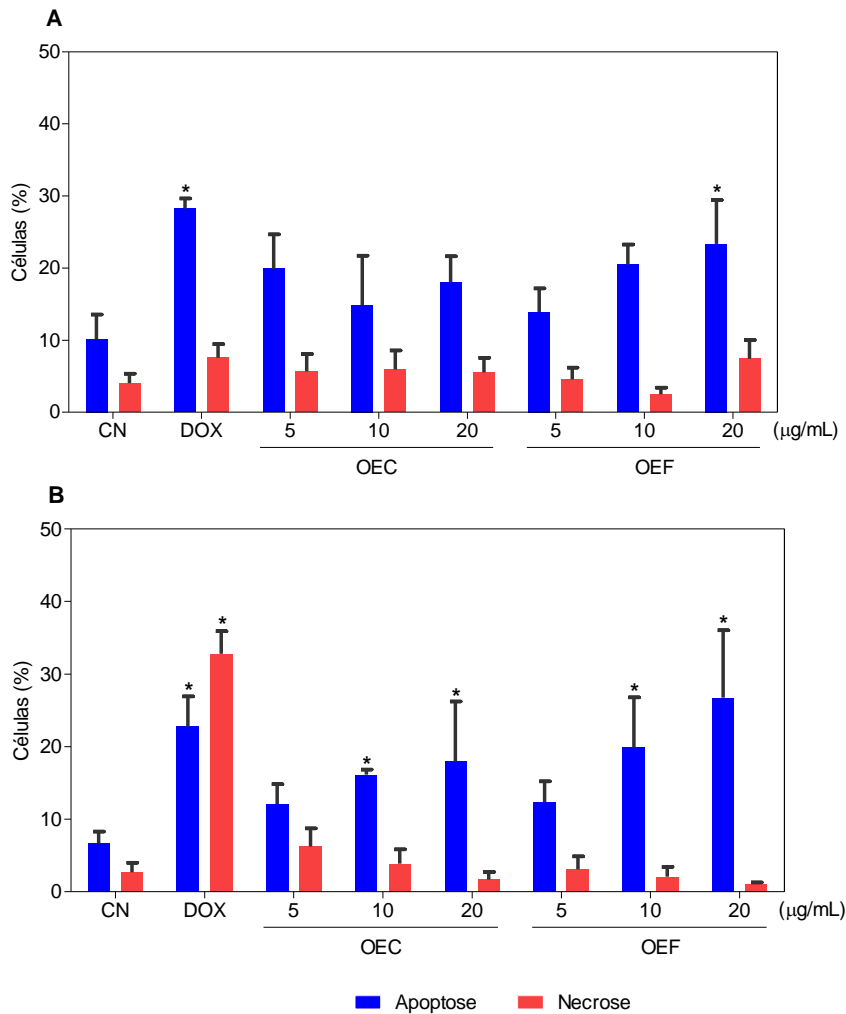


**Figura 5.** Efeito dos OF de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* na distribuição do ciclo celular em células HCT 116, analisadas por citometria de fluxo após 24 (A) e 48 (B) h. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo de diluição dos OE, o DMSO, e doxorubicina (DOX, 0,5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Os dados apresentam as médias  $\pm$  S.E.M. em três experimentos independentes com duplicata. \* $p < 0.05$  comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido de análise múltipla Bonferroni.

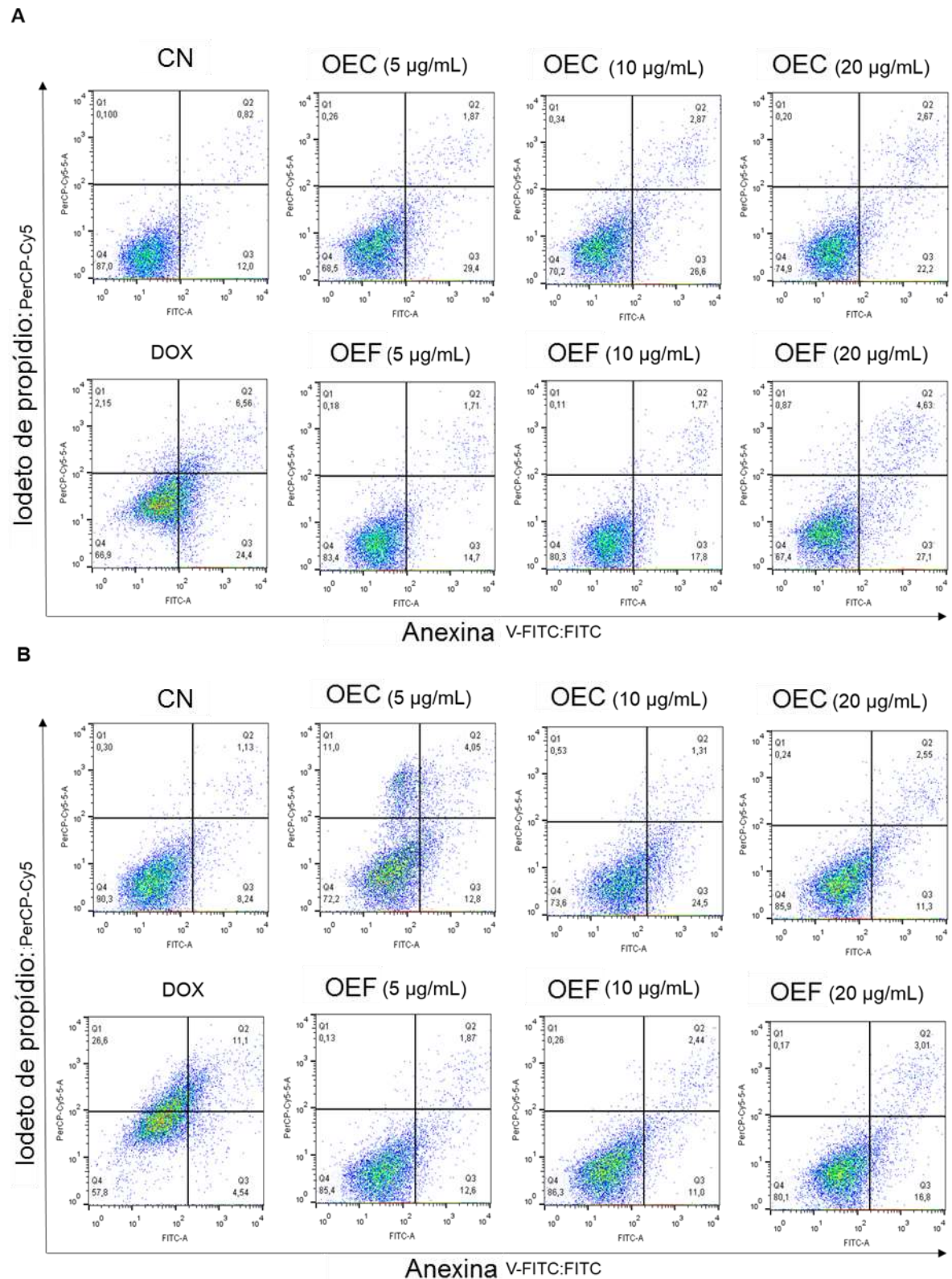
### 5.2.3. Efeito dos dos óleos essenciais de casca e folhas de *Virola surinamensis* sobre a Externalização da Fosfatidiserina

A morte celular foi quantificada por citometria de fluxo utilizando Anexina V-FITC e PI em células HCT116 após 24 e 48 h de tratamento (Figura 6). Na figura 7 encontram-se os *Dot plots* representativos dos experimentos realizados. Os tratamentos com óleos essenciais aumentaram a porcentagem de células em

apoptose após 48 h significativamente ( $p < 0.05$ ). Após 48 h o OEC teve como resultado por volta de 18% de apoptose (apoptose inicial + apoptose tardia), enquanto o OEF obteve um resultado de cerca de 27% na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ . A doxorrubicina também apresentou morte celular por apoptose em 24 h e um aumento de células em necrose após 48 h ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Efeito dos OE de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* na indução de morte celular em células HCT 116, analisadas por citometria de fluxo utilizando anexina V-FITC/PI após 24 (A) e 48 (B) h de tratamento. As células foram classificadas nos seguintes estágios: viáveis, apoptose (apoptose inicial + apoptose tardia) e necrose. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo de diluição dos OE, o DMSO, e doxorrubicina (DOX, 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizado como controle positivo. Os dados apresentam as médias  $\pm$  S.E.M. em três experimentos independentes com duplicata. \*  $p < 0.05$  comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido de análise múltipla Bonferroni.

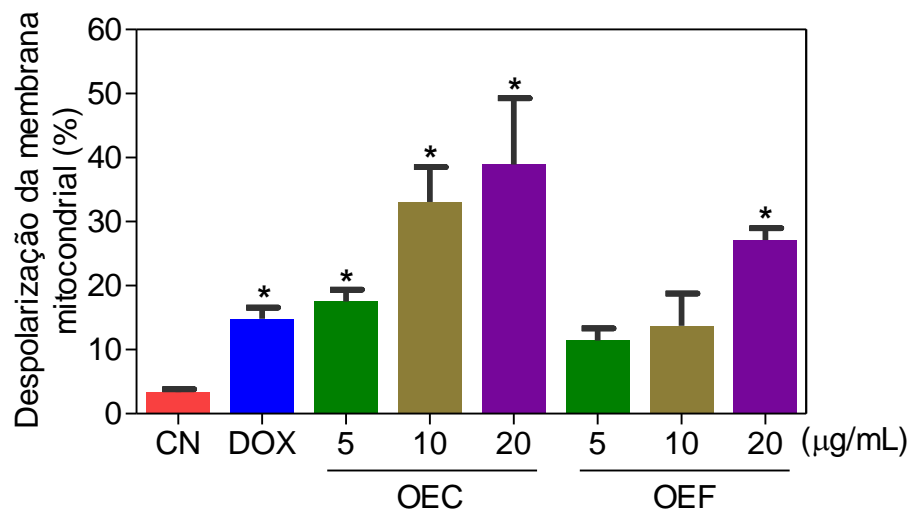


**Figura 7.** Representações dos *Dot plots* de citometria de fluxo representativas da indução de morte celular de células HCT116 tratadas com óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis*, medidas por citometria de fluxo usando coloração com Anexina V-FITC/PI após 24 (A) e 48 (B) h de tratamento. O controle negativo (CN) foi tratado com um veículo (DMSO) usado para diluir OEC e OEF, e a doxorubicina (DOX, 0,5 µg/mL) foi usada como controle positivo.



#### 5.2.4. Efeito dos óleos essenciais (OEC e OEF) sobre a Despolarização Mitochondrial

O potencial transmembrânico mitocondrial foi avaliado em células HCT116 tratadas com OEC e OEF por citometria de fluxo usando coloração rodamina 123. Ambos os OE causaram perda do potencial transmembrânico mitocondrial. O OEC apresentou despolarização mitocondrial nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ , em contrapartida, o OEF apresentou despolarização mitocondrial somente na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 8).

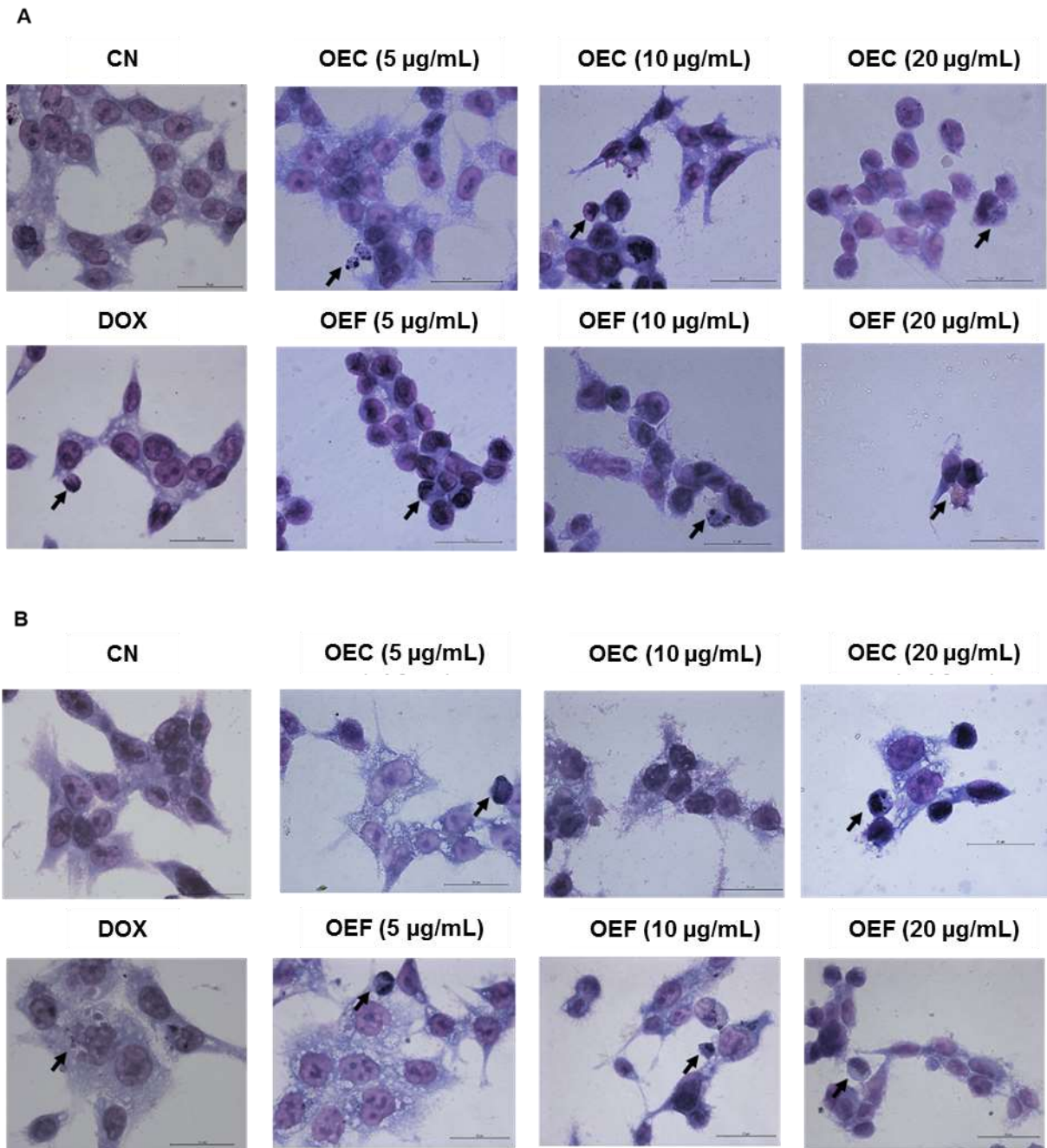


**Figura 8.** Efeito do óleo essencial de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* no potencial da membrana mitocondrial de células HCT116, determinado por citometria de fluxo usando o corante rodamina 123 após 24h de tratamento. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo de diluição dos OE, o DMSO (5%), e doxorubicina (DOX, 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizado como controle positivo. Os dados apresentam as medias  $\pm$  S.E.M. em três experimentos independentes com duplicata. \*  $p < 0.05$  comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido de análise múltipla Bonferroni.

#### 5.2.5. Efeito dos OE estudados na morfologia das células HCT 116

Foi analisado a morfologia celular de células HCT116 coradas por May-Grunwald-Giemsa por microscopia óptica (Figura 9). Diferente da morfologia apresentada no controle negativo, o veículo de diluição, o tratamento com os óleos essenciais (OEC e OEF) promoveu alterações morfológicas como encolhimento celular, células com condensação de cromatina e fragmentação do DNA. Resultado

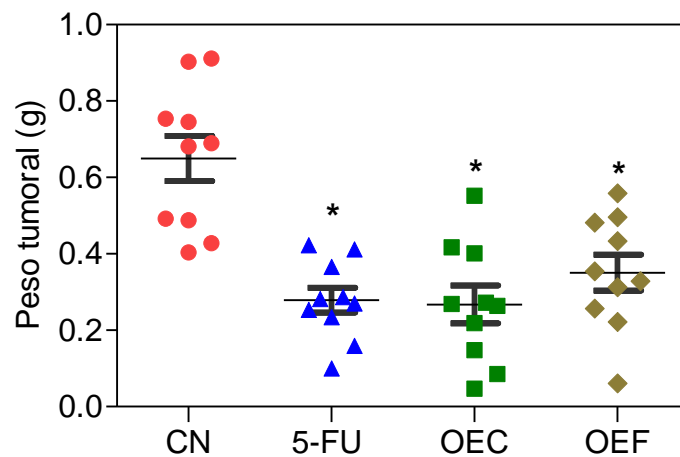
que corrobora com os resultados *in vitro* descritos anteriormente. Todos os achados estão sinalizados com setas pretas na imagem.



**Figura 9.** Efeito dos óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* na morfologia de células HCT116 após 24 (A) e 48 (B) h de tratamento. As células foram coradas com coloração May-Grunwald-Giemsa e examinadas por microscopia óptica (barra = 50 µm). O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo de diluição dos OE, o DMSO, e doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Setas indicam encolhimento celular, células com condensação nuclear ou fragmentação de DNA.

### 5.3. EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DA CASCA E FOLHAS DE *VIROLA SURINAMENSIS* SOBRE A ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

A atividade antitumoral *in vivo* dos óleos essenciais de cascas e folhas de *V. surinamensis* foi investigada em modelo de transplante de xenoenxerto de carcinoma do cólon humano (células HCT116) usando camundongos C.B-17 SCID. Ambos os OE reduziram o desenvolvimento do tumor HCT116 *in vivo* (Figura 10). Nos animais tratados com OEC, a média dos pesos dos tumores foi de  $0,27 \pm 0,05$  g, enquanto nos animais tratados com OEF, a média dos pesos dos tumores foi de  $0,35 \pm 0,05$  g versus  $0,65 \pm 0,06$  g observados no grupo do controle negativo (CN). Por sua vez, as taxas de inibição tumoral *in vivo* foram de 57,9% para OEC e 44,8% para OEF. O 5-fluorouracil foi utilizado como controle positivo e apresentou taxa de inibição tumoral *in vivo* de 56,1%.



**Figura 10.** Efeito dos óleos essenciais de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* em camundongos C.B-17 SCID em modelo xenográfico com células HCT116. Peso tumoral (g) após o tratamento. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo de diluição (DMSO 5%) utilizado na diluição do OEC (40 mg/kg) e OEF (40 mg/kg), e 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) foi utilizado como controle positivo. Os animais foram tratados durante 15 dias consecutivos por via intraperitoneal começando um dia após a implantação do tumor. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  S.E.M. dos 10 animais. \*  $p < 0,05$  comparado com o controle negativo por ANOVA seguido de análise múltipla Bonferroni.

Os parâmetros toxicológicos relacionados ao peso também foram analisados nos animais tratados com os controles e com os OE, e não foram identificadas alterações significativas no peso corporal ou no peso relativo dos órgãos em nenhum dos grupos avaliados ( $P > 0,05$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Efeito do óleo essencial de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* no corpo e peso relativo dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID em modelo de xenoenxerto de células HCT116

Parâmetros	CN	5-FU	OEC	OEF
Dose (mg / kg)	-	10	40	40
Sobrevida	10/10	10/10	10/10	10/10
Peso inicial (g)	23,40 ± 0,31	23,20 ± 0,93	21,85 ± 0,50	23,40 ± 0,61
Peso final (g)	19,83 ± 0,53	17,03 ± 0,99	19,70 ± 0,55	19,09 ± 0,36
Fígado (g/100 g peso corporal)	4,26 ± 0,14	4,60 ± 0,26	4,70 ± 0,19	4,85 ± 0,23
Rins (g/100 g peso corporal)	1,42 ± 0,04	1,41 ± 0,12	1,50 ± 0,08	1,51 ± 0,07
Coração (g/100 g peso corporal)	0,51 ± 0,02	0,58 ± 0,05	0,55 ± 0,03	0,54 ± 0,02
Pulmão (g/100 g peso corporal)	0,74 ± 0,02	0,81 ± 0,97	0,74 ± 0,06	0,77 ± 0,03

Controle negativo (CN) tratado com veículo de diluição dos tratamentos (DMSO 5%). Os dados apresentados representam a média ± S.E.M. de 10 animais.

Os parâmetros hematológicos, contagem total de leucócitos e contagem diferencial de granulócitos, linfócitos e monócitos, também foram analisados (Tabela 8). Os dados revelam que não houve alterações estatisticamente significativas nos parâmetros hematológicos avaliados dos animais tratados com OEC e OEF ou nos grupos controle ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 8:** Efeito do óleo essencial de casca (OEC) e folhas (OEF) de *Virola surinamensis* nos parâmetros hematológicos do sangue periférico de amostras dos camundongos C.B-17 SCID em modelo de xenoenxerto de células HCT116

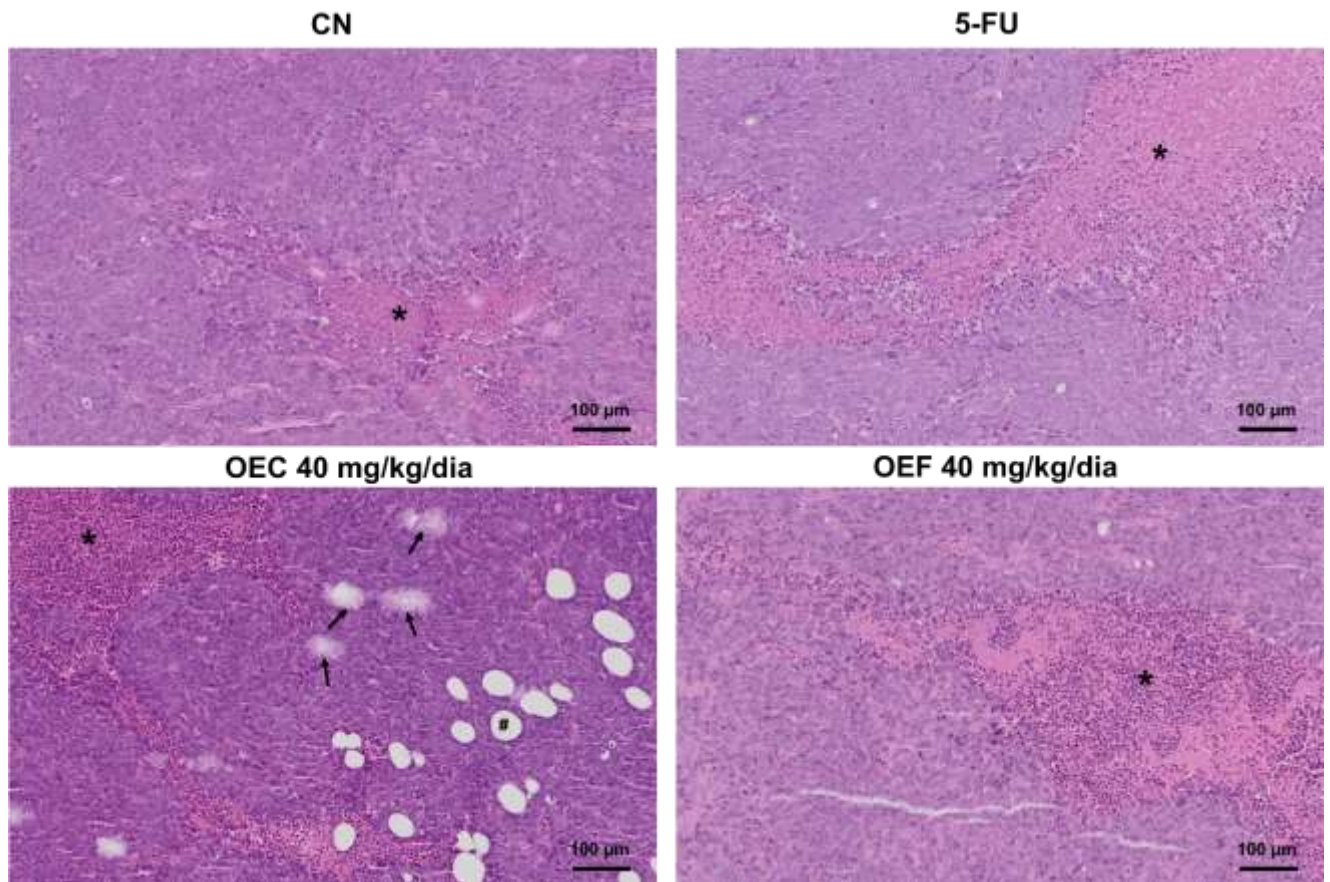
Parâmetros	CN	5-FU	OEC	OEF
Dose (mg/kg)	-	10	40	40
Eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	7,44 ± 0,79	6,88 ± 0,83	8,94 ± 0,39	8,46 ± 0,51
Hemoglobina (g/dL)	13,20 ± 1,04	9,37 ± 1,17	12,2 ± 0,55	11,4 ± 0,63
Hematócrito (%)	41,04 ± 3,40	29,43 ± 3,55	37,54 ± 1,62	36,29 ± 2,17
VCM (fL)	45,43 ± 2,10	42,71 ± 0,29	42,29 ± 0,18	43,00 ± 0,38
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	1072,0 ± 137,0	916,9 ± 110,0	1486,0 ± 78,18	1297,0 ± 90,99
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	8,90 ± 1,65	7,69 ± 1,72	9,63 ± 0,86	9,0 ± 0,79
Leucócitos diferenciados (%)				
Granulocitos	23,06 ± 2,41	21,35 ± 3,19	17,73 ± 1,85	26,73 ± 2,42
Linfócitos	60,13 ± 2,65	63,20 ± 3,33	65,4 ± 2,5	54,5 ± 2,7
Monócitos	16,81 ± 0,55	15,45 ± 0,37	16,86 ± 0,79	17,31 ± 0,70

Controle negativo (CN) tratado com veículo de diluição dos tratamentos (DMSO 5%). Os dados apresentados representam a média ± S.E.M. de 7 animais.

Por meio de HE, as alterações histológicas dos tumores xenoenxertados foram analisadas nos grupos experimentais (OEC e OEF), comparando com 5-FU (controle positivo) e DMSO (controle negativo). Todos os grupos exibiram tumor epitelial sólido com uma heterogeneidade intra-tumoral, mitoses atípicas e pleomorfismo celular (Figura 11).

Dentre os achados encontrados, as áreas de necrose foram comuns a todos os grupos, sendo mais evidentes nos tumores dos animais tratados com 5-FU e OEF, como indicado pelos asteriscos. Um aumento de células secretoras e infiltração de células inflamatórias no tumor e tecido periférico foram observados no grupo OEC. Adicionalmente, as setas indicam a presença de muco. A coloração intensamente roseada indica intenso pleomorfismo, alterações nucleares e celulares.

Observa-se tecido em necrose no tumor do controle negativo, o que pode estar relacionado com isquemia, falta de vascularização e conseqüentemente falta de nutrientes no interior do tumor.



**Figura 11.** Análises histológicas dos tumores. Coloração com hematoxilina e eosina analisado por microscopia óptica. Asteriscos indicam áreas de necrose com infiltração de células inflamatórias e as setas indicam a presença de material mucoso. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo de diluição (DMSO 5%) utilizado na diluição do OEC (40 mg/kg) e OEF (40 mg/kg), e 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) foi utilizado como controle positivo. Os animais foram tratados durante 15 dias consecutivos por via intraperitoneal começando um dia após a implantação do tumor.

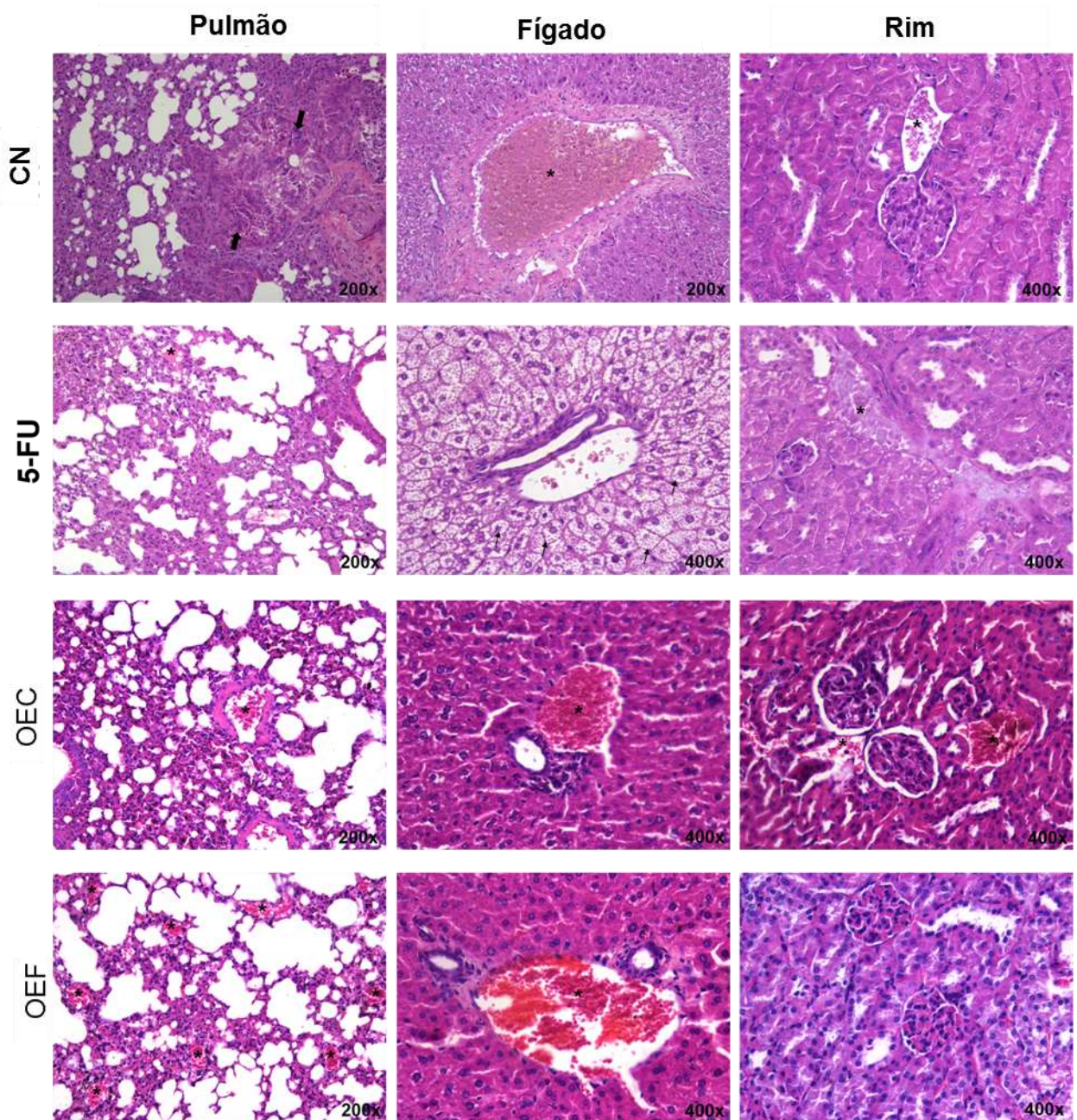
A figura 12 indica as alterações histológicas dos órgãos (fígado, pulmões e rins) nos grupos experimentais (OEC, OEF), comparando com 5-FU (controle positivo) e DMSO (controle negativo). Os asteriscos indicam áreas de congestionamento vascular, o que inicialmente pode indicar uma resposta inflamatória natural do corpo. Nos rins, a arquitetura do tecido foi preservada em todos os grupos experimentais, mas foram observadas alterações morfológicas, como congestão vascular e espessamento da membrana basal do glomérulo renal, com diminuição do espaço urinário em todos os rins, variando de leve a grave.

No fígado, a arquitetura acinar e as veias centrolobulares também foram preservadas nos grupos OEC e OEF e parcialmente preservada nos grupos controle negativo e positivo, DMSO e 5-FU, respectivamente. Áreas focais de inflamação e congestão foram observadas em todos os grupos experimentais. As setas finas indicam



esteatose microgoticular. Outros achados, como degeneração hidrópica e necrose de coagulação, foram encontrados nos grupos DMSO e 5-FU, variando de leve a moderado.

Adicionalmente, ainda na figura 12, nos pulmões, a arquitetura do parênquima foi parcialmente mantida em todos os grupos, enquanto um espessamento do septo alveolar foi observado, resultando em diminuição do espaço aéreo, variando de áreas focais a generalizadas nos tecidos analisados. A análise histopatológica dos pulmões revelou inflamação importante, predominantemente aguda, com edema, hiperplasia de células do parênquima pulmonar e congestão vascular. Hemorragia focal e pigmentos de hemossiderina foram observados nos pulmões de alguns animais neste estudo. É importante notar que embolia tumoral foi observada em pulmões de dois animais do grupo controle negativo (DMSO 5%), identificado através das setas grossas. Os achados encontrados nos tecidos pulmonares podem ser provenientes devido a morte dos animais e uso de anestésicos. Os corações dos animais neste estudo não mostraram alterações morfológicas significativas.



**Figura 12.** Análises histológica representativas dos pulmões, fígado e rins corados com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia óptica. O controle negativo (CN) foi tratado com o veículo (5% DMSO) usado para diluir o OEC (40 mg/kg) e o OEF (40 mg/kg), o 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg/kg) foi usado como controle positivo. Asteriscos indicam as áreas de congestão vascular; setas grossas representam êmbolos tumorais no pulmão e setas finas indicam esteatose microgótica no fígado.



## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que os óleos essenciais de casca e folhas de *V. surinamensis* são capazes de inibir a proliferação de células HCT 116 tanto em modelo *in vitro* quanto *in vivo* em camundongos C.B-17 SCID em modelo de xenoenxerto de células HCT 116.

A análise da composição química dos óleos essenciais de *V. surinamensis* identificou que os constituintes em maior concentração no OEC foram aristoleno,  $\alpha$ -gurjuneno, valenceno, germacreno D,  $\delta$ -guaieno e  $\alpha$ -guaieno; por outro lado, os constituintes principais no OEF foram  $\alpha$ -farneseno,  $\beta$ -elemeno, biciclogermacreno, germacreno D,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno e elemicina. Como destacado nos resultados do presente estudo, foram encontrados no óleo essencial de casca 19 picos identificados; em contrapartida, o óleo essencial de folha apresentou 39 picos identificados, uma composição muito mais diversificada. Ambos apresentaram uma predominância de sesquiterpenos. É importante salientar que as folhas e casca de *V. surinamensis* foram coletadas sob a forma de material seco em fazenda privada no estado do Amazonas, Brasil em dezembro de 2014, sob a ocorrência de época de chuva na região. Os resultados encontrados corroboram com estudo anterior de Lopes e colaboradores (1997) indicando a predominância os sesquiterpenos nestes OE durante o período chuvoso nesta região.

Estudos fitoquímicos com espécies da família Myristicaceae, família da *V. surinamensis*, tem mostrado o acúmulo de constituintes lignoides na composição química das espécies vegetais desta família (MORAIS, *et al*, 2009). Resultado este diferente do encontrado neste estudo que encontrou como principais constituintes os sesquiterpenos. Em contrapartida, os sesquiterpenos são constituintes bem comuns em óleos essenciais. Sesquiterpenos isolados já apresentaram atividade citotóxica relacionada com indução da apoptose, ação sobre o ciclo celular, bem como pela inibição de fatores pró-angiogênicos, invasivos proliferativos, entre outros (AMBROŽ, *et al*, 2015).

Zhang e colaboradores (2015) estudando o  $\beta$ -elemeno comprovaram sua atividade citotóxica frente a linhagens tumorais, neste estudo o  $\beta$ -elemeno reverteu a resistência a drogas anticâncer de mama e alterou a expressão de miRNAs.

Em estudo realizado com *Zornia brasiliensis*, que também possui atividade citotóxica, foi encontrado como um dos componentes majoritários o germacreno D (COSTA *et al.*, 2015). O óleo essencial de folhas de *Guatteria pogonopus* tem efeito antitumoral e também foi encontrado como constituinte  $\beta$ -Elemeno, germacreno D e biciclogermacreno (FONTES *et al.*, 2013). O germacreno D e o biciclogermacreno também foram encontrados como componentes químicos em um estudo de citotoxicidade com *Xylopija laevigata* (MENEZES *et al.*, 2016). Figueiredo e colaboradores (2018) analisando OE e extratos de *Eugenia uniflora* encontraram como constituintes majoritários sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

Pavithra, Mehta e Verma (2018) estudando o óleo essencial de *Pamburus missionis* no câncer de pele epidermóide também encontraram o  $\alpha$ -farnesene como um dos constituintes químicos. Embora alguns componentes encontrados possuam potencial citotóxico descrito na literatura, são necessários mais estudos para indicar quais componentes ou combinações são responsáveis pelo potencial citotóxico de OEC e OEF.

Na nossa triagem de substâncias citotóxicas, extratos e OE com valores de  $Cl_{50}$  abaixo de 30  $\mu\text{g/mL}$  em ensaios baseados em células cancerígenas são considerados promissores (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990; RIBEIRO *et al.*, 2012; FERRAZ *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2019). Neste estudo, ambos os OE apresentaram valores de  $Cl_{50}$  abaixo de 30  $\mu\text{g/mL}$  nas diferentes linhagens tumorais selecionadas para avaliação dos compostos-teste. Além disso, os OE foram capazes de reduzir a viabilidade celular tanto em 24 h quanto em 48 h, analisada pelo ensaio de exclusão de azul de tripam.

Não há relatos na literatura sobre a citotoxicidade dos óleos essenciais de *V. surinamensis* e também do gênero *Virola*; no entanto, o (Z)-3,5,4'-trimetoxisilbeno, um polifenol encontrado em *V. cuspidate* e *V. elongata*, é citotóxico para Caco-2 (adenocarcinoma do cólon humano,  $Cl_{50} = 0,25 \mu\text{M}$ ), SW-480 (adenocarcinoma do cólon humano,  $Cl_{50} = 0,23 \mu\text{M}$ ), SW-620 (células metastáticas derivadas de SW-480,  $Cl_{50} = 0,20 \mu\text{M}$ ), KB (câncer de cabeça e pescoço humano,  $Cl_{50} = 0,08 \mu\text{M}$ ) e células TK-6 (linfoma humano,  $Cl_{50} = 0,10 \mu\text{M}$ ). Este também inibiu a polimerização da tubulina e causou a interrupção do ciclo celular na fase  $G_2/M$  das células Caco-2 (CHABERT *et al.*, 2006).

Diversos óleos essenciais provenientes da floresta amazônica com potenciais semelhantes (abaixo de 30 µg/mL) são descritos na literatura, como OE de *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) valores entre 12,51 µg/mL para células HL-60 (menor valor) e 35,45 µg/mL para MCF-7 (maior valor) (COSTA *et al.*, 2020). Os OE de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) apresentaram valores IC<sub>50</sub> para HCT 116 de E2: 16,26 µg/mL e E4: 9,28 µg/mL, em células AGP-01 E2: 12,60 µg/mL e E4: 8,73 µg/mL e SKMEL-19 E2: 12,20 µg/mL e E4: 15,42 µg/mL (FIGUEIREDO *et al.*, 2019).

Spyridopoulou e colaboradores (2019) analisando o óleo essencial extraído de *Origanum onites* L. também encontrou potencial citotóxico dependente da concentração em diferentes linhagens, o efeito antiproliferativo (valor de CI<sub>50</sub> por 72 h) foi observado em linhagem celular de câncer de cólon HT-29 (0,35 ± 0,2 µg/mL) seguido por linhagem melanoma A375 (8,90 ± 0,7 µg/mL), carcinoma de mama MCF-7 (10,0 ± 1,7 µg/mL) e células de carcinoma hepatocelular HepG2 (23,0 ± 4,2 µg/mL).

Diversos óleos essenciais já tiveram seu potencial citotóxico descrito na literatura, podemos citar ainda: OE de *Guatteria friesiana* (W. A. Rodrigues) Erkens e Maas (Annonaceae) apresentou CI<sub>50</sub> com uma variação de 1,7 a 9,4 µg/mL em células HCT-8 e HL-60, respectivamente (BRITTO *et al.*, 2012), *Iryanthera polyneura* Ducke (Myristicaceae) (MARTINS *et al.*, 2019); *Guatteria blepharophylla* Mart. (Annonaceae) com CI<sub>50</sub> variando de 6,03 a 16,46 µg/mL para células HepG2 e K562, respectivamente, e *Guatteria hispida* (R.E. Fr.) Erkens & Maas (Annonaceae) com valores de CI<sub>50</sub> variando de 5,45 a 24,89 µg/ml para linhagens HepG2 e K562, respectivamente (FERRAZ *et al.*, 2014); e o óleo essencial de folhas de *Croton matourensis* Aubl. (Euphorbiaceae) apresentou valores de CI<sub>50</sub>: 23,3 µg/mL para MCF-7, para HCT 116 28,9 µg/mL, 28,5 µg/mL para HepG2 e HL-60: 17,8 µg/mL (LIMA *et al.*, 2018).

Buscando demonstrar o potencial citotóxico dos óleos essenciais, realizou-se diversos experimentos utilizando citometria de fluxo, tendo como resultados a externalização da fosfatidilserina (por análise com Anexina V x PI), fragmentação internucleossomal do DNA e despolarização mitocondrial (utilizando rodamina 123). O que condiz com estudo de Ferraz e grupo (2014) onde encontraram morfologia celular relacionada à morte celular apoptótica, aumento da fragmentação do DNA internucleossômico e ativação da caspase-3 em células HepG2 tratadas com *G. blepharophylla* e OE da folha de *G. hispida*. O OE da folha de *C. matourensis* causou

morte celular em células HepG2 associadas à externalização da fosfatidilserina e fragmentação do DNA sem perda da integridade da membrana celular (LIMA *et al.*, 2018).

Bomfim e colaboradores (2013) demonstraram que três isômeros do eudesmol, álcoois sesquiterpenóides de ocorrência natural, causam despolarização mitocondrial em células HepG2 de maneira dependente da concentração. Pieme e colaboradores (2014) também demonstraram que extratos de *Annona muricata* causam despolarização mitocondrial em células HL-60 de maneira dependente da concentração, além de perda de viabilidade celular, mudanças morfológicas nas células e parada do ciclo celular em G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

O extrato de hibiscus demonstrou-se citotóxico de maneira concentração dependente em diferentes linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231 e ER+ MCF-7) causando morte celular por apoptose (NGUYEN *et al.*, 2019). Em experimentos realizados com o óleo essencial de *Oliveria decumbens vent* também foi encontrado fragmentação do DNA e apoptose inicial em células 4T1 (carcinoma mamário murino) (JAMALI, KAVOOSI e ARDESTANI, 2020). Estudos realizados por Chaparala e colaboradores (2020) demonstrou que o panaxinol, composto bioativo isolado de *Panax quinquefolius* causa dano no DNA e apoptose tanto *in vitro* e *in vivo*.

A partir dos experimentos com cultura de células HCT 116, utilizando a técnica de microscopia óptica foi possível analisar que os OE causam danos celulares como encolhimento celular, condensação de cromatina e fragmentação nuclear. Os compostos também causaram despolarização da membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e externalização da fosfatidilserina nas análises de citometria de fluxo, dando indícios de que ambos os OE causam morte celular por apoptose.

Nos experimentos *in vivo* em camundongos C.B-17 SCID xenoenxertados foi encontrado uma diminuição do peso tumoral dos tratamentos com relação ao controle negativo. Destaca-se que não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros toxicológicos analisados. Neste estudo, também demonstramos que os óleos essenciais de *V. surinamensis* também inibiram o desenvolvimento de tumores provenientes de células HCT 116 no modelo xenoenxerto utilizando dose de 40 mg/kg por via intraperitoneal.

Na figura 8, observa-se as taxas de inibição da massa tumoral, valores de OEC: 57,9 % e OEF: 44,8% nos animais tratados, indicando um efeito benéfico positivo do tratamento utilizado na redução do tumor, pois ambos os grupos tratados apresentaram uma massa tumoral reduzida em relação ao grupo controle. Este resultado corrobora com os estudos *in vitro* de que os OE analisados são eficientes em causar apoptose nas células tumorais.

Destaca-se que não foram observadas mudanças significativas nos parâmetros hematológicos analisados. Com relação as características histológicas analisadas, os tumores tratados com os OE apresentaram áreas de necrose e infiltração por células inflamatórias, não encontradas no controle. Estes resultados também indicam efeitos benéficos dos OE em causar danos ao tumor com tudo sem alterar os outros parâmetros analisados.

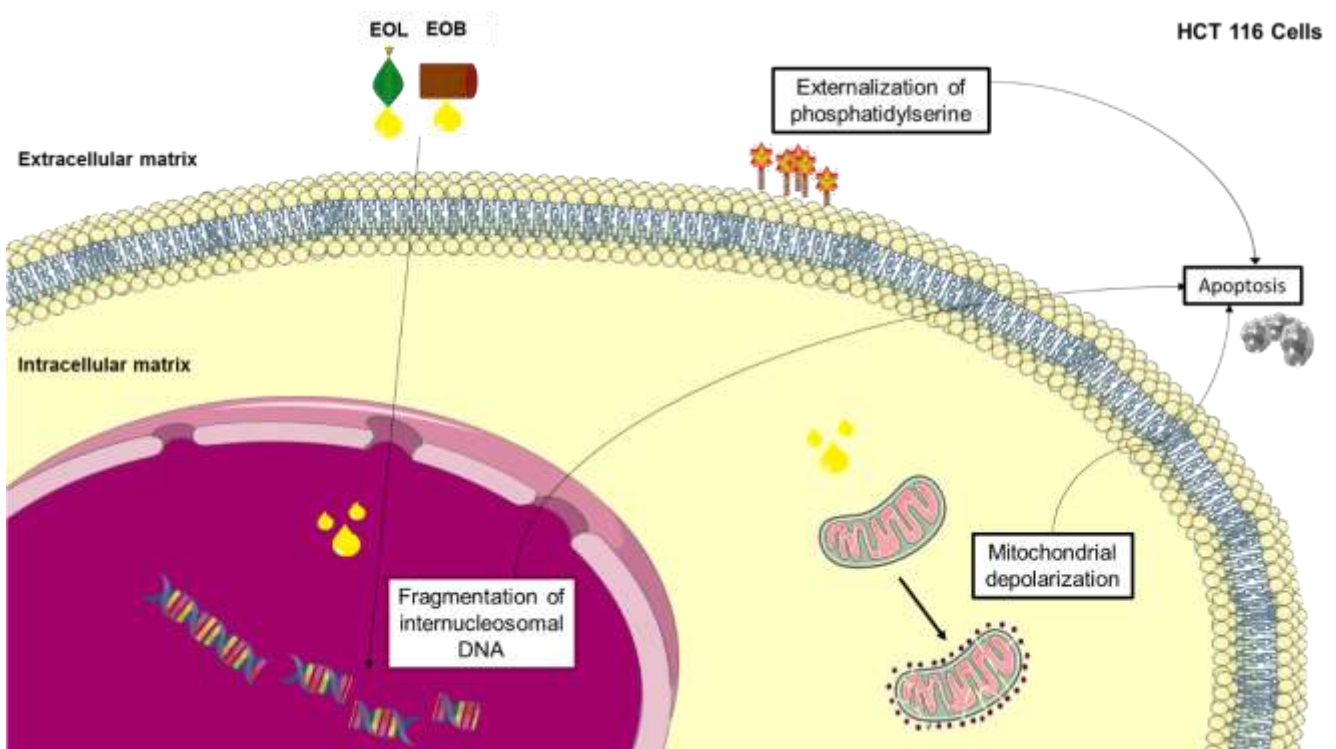
O efeito antitumoral da OE da folha de *G. friesiana* foi previamente estudado em camundongos portadores de Sarcoma 180 e mostrou taxas de inibição do crescimento de tumores de 43,4-54,2% e 6,6-42,8%, quando administrado também por via intraperitoneal (50 e 100 mg/kg) e via oral (100 e 200 mg/kg), respectivamente (BRITTO *et al.*, 2012). O OE da folha de *G. megalophylla* (50 e 100 mg/kg, via intraperitoneal) também foi avaliado em camundongos SCID C.B-17 com xenoenxertos de células HL-60 e exibiu taxas de inibição da massa tumoral de 16,6-48,8% (COSTA *et al.*, 2020).

Diversos estudos *in vivo* utilizando óleos essenciais creditam bons resultados antitumorais em camundongos. O estudo realizado com OE de *Oliveria decumbens vent* em camundongos BALB/c inoculados com células 4T1 com doses de 450 mg/kg a cada dois dias durante duas semanas demonstrou redução do volume tumoral quando comparado com o controle (JAMALI, KAVOOSI e ARDESTANI, 2020). Também foi encontrado redução do volume tumoral quando comparado com o controle em estudos com o óleo essencial de *Origanum onites* L. em camundongos BALB / c inoculados com células CT26 por via de administração oral dose de 0,370 g / kg de peso corporal / dia durante 13 dias (SPYRIDOPOULOU *et al*, 2019).

Adicionalmente, o óleo essencial de folhas de *Croton matourensis* Aubl. (Euphorbiaceae) avaliado em camundongos SCID C.B-17 com xenoenxertos de células HepG2 durante 21 dias por via intraperitoneal apresentou peso do tumor de

0,3 +/- 0,1 g na dose de 40 mg/kg/dia e 0,2 +/- 0,03 g na dose de 80 mg/kg/dia (LIMA *et al*, 2018).

Portanto, os resultados encontrados corroboram com diferentes resultados da literatura científica sobre OE, indicando possível efeito benéfico dos óleos essenciais de *Virola surinamensis* no tratamento de câncer de cólon. Contudo, outros estudos de mecanismos de ação são necessários para uma melhor elucidação dos efeitos antitumorais dos OE e efeito *in vivo* como análise da função renal e enzimas hepáticas, estudos em outras espécies animais, estudos de toxicidade reprodutiva, entre outros, para assegurar os benefícios deste possível tratamento. A figura 13 resume os principais achados *in vitro* deste trabalho quanto aos efeitos dos OE em células de carcinoma de cólon (HCT 116).



**Figura 13.** Resumo gráfico dos resultados *in vitro* do trabalho. Criada a partir de figuras SMART – Servier Medical Art (Creative Commons Licenses).

## 7. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais da casca e das folhas de *V. surinamensis* têm constituintes químicos dominados pelos sesquiterpenos, o que inclui aristoleno,  $\alpha$ -gurjuneno, valenceno como constituintes majoritários em OEC, e  $\alpha$ -farneseno,  $\beta$ -elemeno, biciclogermacreno como constituintes principais em OEF. Sendo interessante uma análise futura dos constituintes separadamente para indicar as substâncias ativas. Ambos os óleos induziram a morte celular em células HCT116 e inibiram o crescimento de tumores no modelo xenoenxerto utilizado, indicando uma possível atividade antitumoral promissora em células cancerígenas do cólon. Embora este trabalho tenha apresentado resultados iniciais promissores, são necessários mais estudos farmacológicos para avaliação desses óleos essenciais.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, S.A. *et al.* A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]-thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4).
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 5.ed, Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALCÂNTARA, Joelma Moreira. **Composição química e potencial biológico dos óleos essenciais de annonaceae dos campi INPA e UFAM**. 2015. 76f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.
- AMBROGGI, M. *et al.* Distance as a Barrier to Cancer Diagnosis and Treatment: Review of the Literature. **The Oncologist**, v. 12, p. 1378-1385, 2015.
- AMBROŽ, M. *et al.* The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. **Molecules**, v. 20, p. 15343-15358, 2015. DOI: 10.3390/molecules200815343
- ARNOLD, M, *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, p. 683–691, 2017. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912
- ATANASOV, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p.1582–1614, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- BALIZA, I.R.S. *et al.* Ruthenium complexes with piplartine cause apoptosis through MAPK signaling by a p53-dependent pathway in human colon carcinoma cells and inhibit tumor development in a xenograft model. **Front. Oncol.**, v. 9, p. 582, 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00582>.
- BARATA, L.E. *et al.* Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589-595, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00240-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00240-5).
- BARATA, L.E.S. *et al.* Neolignans of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 783-785, 1978. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94227-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94227-4).
- BELOZ, A. Brine shrimp bioassay screening of two medicinal plants used by the Warao: *Solanum straminifolium* and *Virola surinamensis*. **J. Ethnopharmacology**, v. 37, p. 225-227, 1992. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90037-R](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90037-R).



BLOWMAN, K. *et al.* Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–30, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3149362>

BOMFIM, D. S., *et al.* Eudesmol Isomers Induce Caspase-Mediated Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 113, p. 300–306, 2013. Doi: 10.1111/bcpt.12097

BRITTO, A.C., *et al.* *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Med.**, v. 78, p. 409-414, 2012. doi: 10.1055/s-0031-1298173. <https://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1298173>.

BRAY, F., *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin.**, v. 68, p. 394–424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.

CAO, Y. *et al.*; *et al.* Cancer research: past, present and future. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, p.749–754, 2011. DOI: 10.1038/nrc3138

CARVALHO, A.A., *et al.* Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*. **Phytother Res.**, v. 24, p. 113-118, 2010. <https://doi.org/10.1002/ptr.2882>.

CHABERT, P., FOUGEROUSSE, A., BROUILLARD, R. Anti-mitotic properties of resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene. **Biofactors**, v. 27, p. 37-46, 2006. <https://doi.org/10.1002/biof.5520270104>.

CHAPARALA, A. *et al.* Panaxynol, a bioactive component of American ginseng, targets macrophages and suppresses colitis in mice. **Oncotarget**, v. 11, n. 22, p. 2026-2036, 2020.

CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, p. 330, 1984.

COSTA, E.S., *et al.* Antimicrobial activity of some medicinal plants of the cerrado, Brazil. **Phytother. Res.**, v. 22, p. 705-707, 2008. <https://doi.org/10.1002/ptr.2397>.

COSTA, E. V., *et al.* Antitumor properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Med**, v. 81, p. 563–567, 2015. Doi: 10.1055/s-0035-1545842.

COSTA, R.G.A., *et al.* *In vitro* and *in vivo* growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) leaf essential oil. **Biomed. Pharmacother.**, v. 122, n. 109713, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109713>

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703–723, 2014.

- DAWOOD, S., AUSTIN, L., CRISTOFANILLI, M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. **Oncology**, v. 28, n. 12, p. 1101-1107, 2014.
- DIAS, R. B. *et al.* **Principles of Cancer Pathogenesis and Therapies: A Brief Overview**. Ed. Springer. Cap 1, 17 p, 2015.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: Editora UNESP, 605 p, 2002.
- FERRAZ, R.P., *et al.* Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, p. 615-621, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.01.015>.
- FERRAZ, R.P.C.; *et al.* Cytotoxic properties of the leaf essential oils of *Guatteria blepharophylla* and *Guatteria hispida* (Annonaceae). **Flavour Frag. J.**, v. 29, p. 228-232, 2014. <https://doi.org/10.1002/ffj.3199>.
- FIGUEIREDO, P.L.B., *et al.* Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. **J. Ethnopharmacology**, v. 232, p. 30-38, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.011>.
- FONTES, J. E. N. *et al.* Antitumor effect of the essential oil from leaves of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Chemistry and Biodiversity**, v.10, n.4, p. 722-729, 2013.
- GALUPPO, S.C.; CARVALHO, J.O.P. **Ecologia, manejo e utilização da *Virola surinamensis* Rol. (Warb.)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 38 p., 2001.
- GEIGER, T. L.; RUBNITZ, J. E. New approaches for the immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia. **Discov Med**, v. 19, n.105, p. 275–284, 2015.
- GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2ª ed., 914 p., 2009.
- HIRUMA-LIMA, C.A., *et al.* Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **J. Ethnopharmacology**, v. 122, p. 406-409, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.023>.
- HUANG, X., *et al.* Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 117, n. 109142, 13 p., 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109142>
- HUANG, C; Y., *et al.* A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. **BioMedicine**, v. 7, n. 4, p. 12-23, 2013.
- JAMALI, T., KAVOOSI, G., ARDESTANI, S. K. *In-vitro* and *in-vivo* anti-breast cancer activity of OEO (*Oliveria decumbens vent* essential oil) through promoting

the apoptosis and immunomodulatory effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 248, n. 112313, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112313>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Ministério da Saúde). **ABC DO CÂNCER**: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer – Incidência de câncer no Brasil. INCA, Rio de Janeiro, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 122p., 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 120 p., 2019.

LIMA, E.J.S.P., *et al.* Antitumor effect of the essential oil from the leaves of *Croton matourensis* Aubl. (Euphorbiaceae). **Molecules**, v. 23, n. E2974, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23112974>.

LOPES, N.P., *et al.* Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. **J. Ethnopharmacol.**, v. 67, p. 313-319, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00072-0).

LOPES, N.P., *et al.* Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med.**, v. 64, p. 667-668, 1998. <https://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957548>.

LOPES, N.P., *et al.* Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**, v. 46, p. 689-693, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00324-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00324-5).

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2 ed., p. 338–339, 2002.

MAGALHAES, L. G.; FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Recent Advances and Perspectives in Cancer Drug Design. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, p. 1–18, 2018.

MARTINS, E.R., *et al.* Interference of seasonal variation on the antimicrobial and cytotoxic activities of the essential oils from the leaves of *Iryanthera polyneura* in the Amazon rain forest. **Chem. Biodivers.**, v. 16, n. e1900374, 2019. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900533>.

MARTIN, S. J. *et al.* Phosphatidylserine externalization during cd95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ice/ced-3 protease activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 28753-28756, 1996.

MENEZES, L. R. A., *et al.* Cytotoxic Alkaloids from the Stem of *Xylopia laevigata*. **Molecules**, v. 21, n. 890, 10 p., 2016.

- MESQUITA, M. L. D. **Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do cerrado brasileiro: Estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica.** [Tese de doutorado]. Universidade de Brasília, Brasília, 223 p., 2009.
- MIRANDA, M. L. D. *et al.* Óleo essencial das flores de *Eugenia klotzschiana* (MYRTACEAE): Sua composição química e atividades tripanocida e citotóxica in vitro. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, 2017.
- MORAIS, S. K. R. *et al.* Biological activities of lignoids from Amazon Myristicaceae species: *Virola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 6, p. 1110-1118, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000600017>.
- NAITO, M. *et al.* Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme family protease activation during apoptosis. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2060-2066, 1997.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J. Nat. Prod**, v. 83, p. 770–803, 2020.
- NGUYEN, C., *et al.* Hibiscus flower extract selectively induces apoptosis in breast cancer cells and positively interacts with common chemotherapeutics. **BMC: Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 98, 14 p., 2019. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2505-9>
- OLIVEIRA, K. A. **Obtenção de extratos padronizados em antioxidantes naturais: aproveitamento dos resíduos da Ucuúba (*Virola surinamensis*).** [Exame de qualificação para dissertação de mestrado] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, 77 p., 2018.
- PAVITHRA, P. S., MEHTA, A., VERMA, R. S. Induction of apoptosis by essential oil from *P. missionis* in skin epidermoid cancer cells. **Phytomedicine**, v. 5, p. 184–195, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.11.004>
- PEREIRA, A. C. H. *et al.* Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleifera*. **PHARMACEUTICAL BIOLOGY**, v. 55, n. 1, p. 472–480, 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1251467>
- PIEME, C. A., *et al.* Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. **BMC: Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 516, 2014. doi: 10.1186/1472-6882-14-516
- PINTO, N. C.C. *et al.* Cytotoxicity and bacterial membrane destabilization induced by *Annona squamosa* L. extracts. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, supl. p. 2053-2073, 2017. <https://doi.org/10.1590/00013765201720150702>

- POSTOVIT, L. *et al.* Harnessing oxidative stress as an innovative target for cancer therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 6135739, 2 p., 2018.
- RAULT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- RIBEIRO, S. S. *et al.* Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. **Planta Med**, v. 78, p. 1601–1606, 2012.
- RODRIGUES, A.C.B.C., *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith (Celastraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 231, p. 516-524, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.008>.
- RODRIGUES, A.C., *et al.* Antitumor properties of the essential oil from the leaves of *Duguetia gardneriana*. **Planta Med.**, v. 81, p. 798-803, 2015.  
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1546130>.
- RODRÍGUEZ-ANTONA, C.; TARON, M. Pharmacogenomic biomarkers for personalized cancer treatment. **Journal of Internal Medicine**, v. 277, n. 2, p. 201-217, 2015.
- RODRIGUES, W.A. Revisão Taxonômica das espécies de *Virola* (Aublet - Myristicaceae) do Brasil. **Acta Amazônica**. v. 10, n. 1, p. 1-127, 1980.
- SABAS, C.V. *et al.* Oncologia Básica. Piauí: Fundação Quixote, 1ª ed. 324 p., 2012.
- SADEGHI, S. *et al.* Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 131-140, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.067>
- SAEZ-RODRIGUEZ, J.; MACNAMARA, A.; COOK, S. Modeling Signaling Networks to Advance New Cancer Therapies. **Annu Rev. Biomed. Eng.**, v. 17, p. 143- 163, 2015.
- SANTOS, L.S., *et al.* Xylopine induces oxidative stress and causes G2/M phase arrest, triggering caspase-mediated apoptosis by p53-independent pathway in HCT116 cells. **Oxid. Med. Cell Longev.**, v. 2017, n. 7126872, 13 p., 2017.  
<https://doi.org/10.1155/2017/7126872>.
- SARQUIS, R.D.S.F.R., *et al.* The use of medicinal plants in the riverside community of the Mazagão river in the Brazilian Amazon, Amapá, Brazil: ethnobotanical and ethnopharmacological studies. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2019, n. 6087509, 25 p., 2019.  
<https://doi.org/10.1155/2019/6087509>.
- SCHULTES, R.E., HOLMSTEDT, B. Miscellaneous notes on Myristicaceous plants of South America. **Lloydia**, v. 34, p. 61–78, 1971.

SHARIF-RAD, J. Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 70, 55 p., 2017.

SILVA, S.L.R., *et al.* Ru(II)-thymine complex causes DNA damage and apoptotic cell death in human colon carcinoma HCT116 cells mediated by JNK/p38/ERK1/2 via a p53-independent signaling. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 11094, 11 p., 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47539-0>.

SILVA, V.R., *et al.* A ruthenium-based 5-fluorouracil complex with enhanced cytotoxicity and apoptosis induction action in HCT116 cells. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 288, 13p., 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18639-6>.

SILVA, T.B., *et al.* Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. **BMC Complement Altern Med.**, v. 16, n. 199, 9 p., 2016. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1166-1>.

SIMAS, N. K. *et al.* Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue-atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Quím nova**, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.

SPYRIDOPOULOU, K., *et al.* Extraction, Chemical Composition, and Anticancer Potential of *Origanum onites* L. Essential Oil. **Molecules**, v. 24, n. 2612, 15 p., 2019. doi:10.3390/molecules24142612.

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J.M. **Assays related to cancer drug discovery**. In: Hostettmann K, editor. *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity*. London: Academic Press, p. 71–133, 1990.

TAKEBE, N.; WARREN, R. Q.; IVY, S. P. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to mesenchymal transition. **Breast Cancer Res.**, v. 13, p. 211, 2011.

TAKEBE, N. *et al.* Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. **Nat. Rev. Clinical Oncology**, v. 12, n. 8, p. 445-464, 2015.

VAN DEN DOOL, H., KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 11, p. 463–471, 1963. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).

VEIGA, A., *et al.* *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*: *In vitro* leishmanicide activity of *Virola surinamensis* (rol.) warb. **Exp. Parasitol.**, v. 175, p. 68-73, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.005>.

VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D. R., BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131–149, 2003.

WATSON, J.L., *et al.* Curcumin induces apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells in a p21-independent manner. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 84, n. 3, p. 230-233, 2008. DOI: 10.1016/j.yexmp.2008.02.002

WHO. **Report on cancer**: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. This work is available under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 IGO licence (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>).

ZHANG, J. *et al.*  $\beta$ -Elemene Reverses Chemoresistance of Breast Cancer Cells by Reducing Resistance Transmission via Exosomes. **Cell Physiol Biochem**, v. 36, p. 2274-2286, 2015. DOI: 10.1159/000430191

## APÊNDICE

Journal of Ethnopharmacology 263 (2020) 113166



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## In vitro and in vivo inhibition of HCT116 cells by essential oils from bark and leaves of *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb. (Myristicaceae)

Talita A. da Anunciação<sup>a</sup>, Rafaela O.A. Costa<sup>a</sup>, Emilyly J.S.P. de Lima<sup>b</sup>, Valdenisla R. Silva<sup>a</sup>, Luciano de S. Santos<sup>a</sup>, Milena B.P. Soares<sup>a</sup>, Rosane B. Dias<sup>a,c</sup>, Clarissa A. Gurgel Rocha<sup>a,c</sup>, Emmanoel V. Costa<sup>d</sup>, Felipe M.A. da Silva<sup>d</sup>, Hector H.F. Koolen<sup>b,\*,\*\*</sup>, Daniel P. Bezerra<sup>a,\*,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Gonçalo Mendes Nutrition, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ/BA), Salvador, Bahia, 40296-710, Brazil

<sup>b</sup> Metabolomics and Mass Spectrometry Research Group, Amazonas State University (UEA), Manaus, Amazonas, 69065-130, Brazil

<sup>c</sup> Department of Clinical Prosthodontics and Integrated Clinical, Faculty of Dentistry, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, 40301-155, Brazil

<sup>d</sup> Department of Chemistry, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, 69090-900, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Virola surinamensis*

Myristicaceae

Cell death

HCT116

Chemical compounds studied in this article:

5-Fluorouracil

Docetaxel

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb. (Myristicaceae), popularly known in Brazil as “mucaba”, “ucuriaba”, “ucuriaba-branca” or “ucuriaba do igapó”, is a medicinal plant used to treat a variety of diseases, including infectious, inflammatory processes and cancer.

**Aim of the study:** In the present work, we investigated the chemical constituents and the in vitro and in vivo inhibition of human colon carcinoma HCT116 cells by essential oils obtained from the bark (EOB) and leaves (EOL) of *V. surinamensis*.

**Materials and methods:** EOB and EOL were obtained by hydrodistillation and analyzed via gas chromatography with flame ionization detection and gas chromatography coupled to mass spectrometry. In vitro cytotoxic activity was determined in cultured cancer cells HCT116, HepG2, HL-60, B16-F10 and MCF-7 and in a non-cancerous cell line MRC-5 by the Alamar blue assay after 72 h of treatment. Acetamin V/propidium iodide staining, mitochondrial transmembrane potential and cell cycle distribution were evaluated by flow cytometry in HCT116 cells treated with essential oils after 24 and 48 h of treatment. The cells were also stained with May-Grunwald-Giemsa to analyze cell morphology. In vivo antitumor activity was evaluated in C.B-17 SCID mice with HCT116 cells.

**Results:** The main constituents in EOB were aristolone (20.0 ± 3.1%), β-gurjunene (15.1 ± 2.4%), valencene (14.1 ± 1.9%), germacrene D (7.5 ± 0.9%), β-guaiene (5.8 ± 1.0%) and β-elemene (5.4 ± 0.6%). On the other hand, EOL displayed β-farnesene (14.5 ± 1.9%), β-elemene (9.6 ± 2.3%), bicyclogermacrene (8.1 ± 2.0%), germacrene D (7.4 ± 0.7%) and β-cubebene (5.6 ± 1.3%) as main constituents. EOB showed IC<sub>50</sub> values for cancer cells ranging from 9.41 to 29.52 μg/ml for HCT116 and B16-F10, while EOL showed IC<sub>50</sub> values for cancer cells ranging from 7.67 to 26.70 μg/ml for HepG2 and HCT116, respectively. The IC<sub>50</sub> value for a non-cancerous MRC-5 cell was 34.7 and 30.93 μg/ml for EOB and EOL, respectively. Both oils induced apoptotic-like cell death in HCT116 cells, as observed by the morphological characteristics of apoptosis, externalization of phosphatidylserine, mitochondrial depolarization and fragmentation of intermitochondrial DNA. At a dose of 40 mg/kg, tumor mass inhibition rates were 57.9 and 44.8% in animals treated with EOB and EOL, respectively. **Conclusion:** These data indicate *V. surinamensis* as possible herbal medicine in the treatment of colon cancer.

**Abbreviations:** 5-FU, 5-fluorouracil; ANOVA, analysis of variance; ATCC, American type culture collection; DMSO, dimethyl sulfoxide; DOX, docetaxel; EOB, essential oil from bark; EOL, essential oil from leaves; GC-FID, gas chromatography with flame ionization detection; GC-MS, gas chromatography coupled to mass spectrometry; IC<sub>50</sub>, half-maximum inhibitory concentration; INPA, National Institute of Research of the Amazon; NC, negative control; PI, propidium iodide; RI, retention indices; SCID, severe combined immunodeficient; SI, selectivity index; TBE, trypan blue exclusion.

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

**E-mail addresses:** [tal.andrado@gmail.com](mailto:tal.andrado@gmail.com) (T.A. Anunciação), [rafco@fio.org.br](mailto:rafco@fio.org.br) (R.O.A. Costa), [emilylysilva@uea.edu.br](mailto:emilylysilva@uea.edu.br) (E.J.S.P. Lima), [valdenisla@gmail.com](mailto:valdenisla@gmail.com) (V.R. Silva), [luciano.biomed@gmail.com](mailto:luciano.biomed@gmail.com) (L.S. Santos), [mlena\\_soares@uea.edu.br](mailto:mlena_soares@uea.edu.br) (M.B.P. Soares), [rosanebd@gmail.com](mailto:rosanebd@gmail.com) (R.B. Dias), [clarissa.gurgel@uea.edu.br](mailto:clarissa.gurgel@uea.edu.br) (C.A.G. Rocha), [emmanoelvc@gmail.com](mailto:emmanoelvc@gmail.com) (E.V. Costa), [felipeapartma@uea.edu.br](mailto:felipeapartma@uea.edu.br) (F.M.A. Silva), [hkoolen@uea.edu.br](mailto:hkoolen@uea.edu.br) (H.H.F. Koolen), [daniel.bezerra@uea.edu.br](mailto:daniel.bezerra@uea.edu.br) (D.P. Bezerra).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113166>

Received 23 April 2020; Received in revised form 16 June 2020; Accepted 4 July 2020

Available online 27 July 2020

0378-8741/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Apêndice 1. Capa do artigo gerado pelo trabalho.