

**PATRÍCIA MOREIRA VALENTE**

**ATIVIDADE ANTICÂNCER DE EXTRATOS DE *Passiflora edulis* E *Passiflora setacea*  
E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cyanocephalus rugosus* E *Cantinoa carpinifolia* IN  
VITRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Anésia Aparecida dos Santos

Coorientadora: Vânia Maria Moreira Valente

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V154a Valente, Patrícia Moreira, 1993-  
2023 Atividade anticâncer de extratos de *Passiflora edulis* e  
*Passiflora setacea* e dos óleos essenciais de *Cyanocephalus  
rugosus* e *Cantinoa carpinifolia in vitro* / Patrícia Moreira  
Valente. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (124 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Anésia Aparecida dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.583>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Essências e óleos essenciais - Uso terapêutico. 2. Câncer  
- Tratamento. 3. *Passiflora*. 4. *Lamiaceae*. 5. Maracujá.  
I. Santos, Anésia Aparecida dos, 1969-. II. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 547.71


**PATRÍCIA MOREIRA VALENTE**

**ATIVIDADE ANTICÂNCER DE EXTRATOS DE *Passiflora edulis* E *Passiflora setacea*  
E DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cyanocephalus rugosus* E *Cantinoa carpinifolia* IN  
VITRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 11 de agosto de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 PATRÍCIA MOREIRA VALENTE  
Data: 28/09/2023 17:19:23-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Patrícia Moreira Valente  
Autora

Documento assinado digitalmente  
 ANÉSIA APARECIDA DOS SANTOS  
Data: 29/09/2023 17:47:22-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Anésia Aparecida dos Santos  
Orientadora

*A minha mãe e a minha avó.*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe que me mostrou que este caminho era possível.

À minha família por sempre acreditar nos meus sonhos e na minha capacidade de conquista-los.

À professora Anésia pela orientação e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Aos meus companheiros de trabalho: Franciele, Mariá, Amanda, Marcela, Bárbara, Arlindo, Isabela e Gabriela, pela ajuda, amizade, ensinamentos e momentos de descontração.

Aos meus companheiros da pós graduação em biologia celular e estrutural que foram essenciais para um melhor aproveitamento das disciplinas e da vida pré-pandemia.

Aos meus amigos que, de perto ou de longe, me ajudaram a manter a sanidade nesta longa trajetória.

Às minhas companhias felinas e ao meu companheiro Davi que me acompanharam e ajudaram a tornar os dias mais leves.

Aos membros da banca que contribuíram para o enriquecimento desta tese.

Aos profissionais e professores do programa de pós graduação em Biologia celular e estrutural, em especial o professor Serrão e a secretária Beth, por fazerem um trabalho tão bonito e humano.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

*“Minha esperança é necessária mas não é suficiente. Ela, só, não ganha a luta, mas sem ela a luta fraqueja e titubeia”.*  
(Paulo Freire)

## RESUMO

VALENTE, Patrícia Morera, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Atividade anticâncer de extratos de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* e dos óleos essenciais de *Cyanocephalus rugosus* e *Cantinoa carpinifolia* in vitro.** Orientadora: Anésia Aparecida dos Santos. Coorientadora: Vânia Maria Moreira Valente.

As famílias Passifloraceae e Lamiaceae possuem uma grande diversidade natural, sobretudo no Brasil. Diversas espécies já foram relatadas como fonte de compostos bioativos contra diferentes células cancerosas. O objetivo deste foi avaliar o potencial anticâncer e a composição química de extratos de acetato de etila de *Passiflora edulis* (SPE) e *Passiflora setacea* (SPS), além dos óleos essenciais de *Cyanocephalus rugosus* (CR) e *Cantinoa carpinifolia* (CC), coletadas no Cerrado (MG). A atividade citotóxica foi avaliada através de ensaio de MTT nas linhagens B16F10, 4T1, melan-a, VERO, SW480, HEPG-2, para o cálculo dos valores de IC<sub>50</sub> e os índices de seletividade (IS), enquanto o tipo de morte celular e as variações no ciclo celular foram avaliadas em diferentes linhagens por citometria de fluxo e microscopia de luz. Os extratos foram obtidos de sementes, folhas e cascas por extração líquido-líquido e os óleos essenciais foram obtidos de folhas e flores por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/EM). Nos extratos SPE e SPS foram identificados apenas ácidos graxos. O ácido linoléico foi o composto majoritário (CM) em ambos, com maiores concentrações em SPE (74,35 %), comparado a SPS (64,75 %), seguido pelos ÁO (ácido oleico) e ÁP (ácido palmítico), em menores concentrações. O ÁO e o ÁP também tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas. Os CM no óleo de flores e folhas de CR foram: β-cariofileno (22,84 %), Germacreno D (19,97 %), δ-Acoradieno (11,71 %), Epatulenol (8,30 %) e Tau-cadinol (5,30 %); no óleo de folhas de CR foram: Germacreno D (16,11 %), β-cariofileno (12,51 %), Epatulenol (12,16 %), δ-Acoradieno (11,98 %) e Óxido de cariofileno (6,49 %); no óleo de flores de CC: α-Tujona (43,13 %), Sabineno (8,86 %), Epatulenol (7,92 %), Óxido de cariofileno (5,41 %) e β-Tujona (5,13 %) e no óleo de folhas de CC: α-Tujona (46,049 %), Epatulenol (6,72 %), Sabineno (6,062 %), Isocariofileno (5,093 %) e α-Copaeno (4,797 %). O IS de SPS foi de 2,64 para B16F10 e 8,03 para SW480, enquanto SPE exibiu IS de 10,91 para a mesma. O ÁP exibiu IS de 2,19 para 4T1. O IS do óleo de folhas e flores de CR foi de 4,72 para HEPG-2 e do óleo das flores de CC foi de 2,71 para SW480. O tipo de morte

celular desencadeado pelo extrato SPS nas células B16F10 foi a apoptose e para SW480 foi observado um acúmulo de células na fase G2-M associado a um aumento de DNA fragmentado e células vacuolizadas. Nas células 4T1 o AP também levou ao acúmulo de células em G2-M e aumento de fragmentação do DNA. O mecanismo de ação identificado para o óleo de folhas de CR nas células HEPG-2 foi morte celular por apoptose com fragmentação do DNA. Enquanto os óleos de folhas e flores de CR e das flores de CC induziram a morte celular por apoptose, conforme foi identificado na análise de morfologia celular por microscopia de luz. Esses achados indicam que os extratos SPE e SPS e os óleos essenciais de CR e CC possuem atividade anticâncer com seletividades promissoras *in vitro* e podem ser considerados na busca por compostos naturais com atividade anticâncer.

Palavras-chave: Câncer. Cerrado. Epatulenol. *Hyptis*. Maracujá. MTT. Rosmarinho.

## ABSTRACT

VALENTE, Patrícia Morera, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **Anticancer activity of extracts of *Passiflora edulis* and *Passiflora setacea* and essential oils of *Cyanocephalus rugosus* and *Cantinoa carpinifolia* in vitro.** Adviser: Anésia Aparecida dos Santos. Co-adviser: Vânia Maria Moreira Valente.

The Passifloraceae and Lamiaceae families have a great natural diversity, especially in Brazil. Several species have already been reported as a source of bioactive compounds against different cancer cells. The aim of this study was to evaluate the anticancer potential and chemical composition of ethyl acetate extracts from *Passiflora edulis* (SPE) and *Passiflora setacea* (SPS), in addition to essential oils from *Cyanocephalus rugosus* (CR) and *Cantinoa carpinifolia* (CC), collected in the Cerrado (MG). Cytotoxic activity was evaluated by MTT assay on B16F10, 4T1, melan-a, VERO, SW480 and HEPG-2 cell lines for the calculation of IC<sub>50</sub> values and selectivity indices (SI), while the type of cell death and variations in the cell cycle were evaluated in different cell lines by flow cytometry and light microscopy. Extracts were obtained from seeds, leaves and bark by liquid-liquid extraction and essential oils were obtained from leaves and flowers by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). In the SPE and SPS extracts, only fatty acids were identified. Linoleic acid was the major compound (MC) in both, with higher concentrations in SPE (74.35 %), compared to SPS (64.75 %), followed by OA (oleic acid) and PA (palmitic acid), in lower concentrations. OA and PA also had their cytotoxic activities evaluated. The MC in the oil of CR flowers and leaves were:  $\beta$ -caryophyllene (22.84 %), Germacrene D (19.97 %),  $\delta$ -Acoradiene (11.71 %), Spathulenol (8.30 %) and Tau -cadinol (5.30 %); in CR leaf oil were: Germacrene D (16.11 %),  $\beta$ -caryophyllene (12.51 %), Spathulenol (12.16 %),  $\delta$ -Acoradiene (11.98 %) and Caryophyllene oxide (6.49 %); in CC flower oil:  $\alpha$ -Thujone (43.13 %), Sabinene (8.86 %), Spathulenol (7.92 %), Caryophyllene oxide (5.41 %) and  $\beta$ -Thujone (5.13 %) and in CC leaf oil:  $\alpha$ -Thujone (46.049 %), Spathulenol (6.72 %), Sabinene (6.062 %), Isokaryophyllene (5.093 %) and  $\alpha$ -Copaene (4.797%). The SI of SPS was 2.64 for B16F10 and 8.03 for SW480, while SPE showed SI of 10.91 for it. The PA exhibited a SI of 2.19 for 4T1. The SI of CR leaf and flower oil was 4.72 for HEPG-2 and CC flower oil was 2.81 for SW480. The type of cell death triggered by the SPS extract in B16F10 cells was apoptosis and for

SW480 an accumulation of cells in the G2-M phase was observed associated with an increase in fragmented DNA and vacuolated cells. In 4T1 cells PA also led to accumulation of cells in G2-M and increased DNA fragmentation. The mechanism of action identified for CR leaf oil on HEPG-2 cells was cell death by apoptosis with DNA fragmentation. While the oils from leaves and flowers of CR and CC flowers induced cell death by apoptosis, as identified in the analysis of cell morphology by light microscopy. These findings indicate that SPE and SPS extracts and CR and CC essential oils have anticancer activity with promising *in vitro* selectivities and can be considered in the search for natural compounds with anticancer activity.

Keywords: Cancer. Cerrado. Hyptis. MTT. Passion fruit. Rosemary. Spatulanol.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3T3	fibroblastos murinos
4T1	câncer de mama murino
A2780	carcinoma de ovário humano
A37	melanoma maligno
ABC	cassete de ligação de ATP humano
ANOVA	análise de variância
ÁO	ácido oleico
ÁP	ácido palmítico
APAF-1	fator ativador de protease apoptótica 1
APC	complexo promotor de anáfase
ARID2	proteína 2 com domínio de interação rica em AT
B16F10	melanoma murino
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BCRP/ABCG2	proteína de resistência ao câncer de mama
BGM	células de rim de macaco verde africano
BRAF	proto-oncogene B-Raf
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CC Flores	óleo de flores de <i>Cantinoa carpinifolia</i>
CC Folhas	óleo de folhas de <i>Cantinoa carpinifolia</i>
CCL-1	fibroblasto de tecido conjuntivo murino
CDKN2A	inibidor de quinase dependente de ciclina 2a
CG/EM	cromatografia gasosa e espectrometria de massas
CM	constituintes majoritários
CPE	casca de <i>Passiflora edulis</i>
CPS	casca de <i>Passiflora setacea</i>
CR	óleo essencial de folhas e flores de <i>Ceanocephalus rugosus</i>
CRF	óleo essencial de folhas de <i>Ceanocephalus rugosus</i>
CYP450	citocromo P450
DLD-1	adenocarcinoma colorretal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	dimetilsulfóxido

DNA ácido desoxirribonucleico  
DU145 câncer de próstata humano  
EAC carcinoma ascítico de Ehrlich  
EGFR receptor do fator de crescimento epidérmico  
EROs espécies reativas de oxigênio  
ES2 câncer de ovário  
FADD/MORT-1 proteína de domínio de morte associada ao Fas  
FITC isotiocianato de fluoresceína  
FPS folha de *Passiflora setacea*  
HCT carcinoma de cólon humano  
HDACi inibidores de histonas desacetilases  
HEPG-2 carcinoma hepatocelular  
HIF1 $\alpha$  fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$   
HCT-8 adenocarcinoma ileocecal humano  
HIV Vírus da Imunodeficiência Humana  
HT-116 câncer de colón humano  
IC10 concentração inibitória de 10% das células  
IC50 concentração inibitória de 50% das células  
IC90 concentração inibitória de 90% das células  
INCA Instituto Nacional do Câncer  
IS índice de seletividade  
K562 leucemia mieloide  
KB carcinoma epidermóide  
KIT receptor tirosina quinase  
KRAS gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten  
LAPAC/DPF Laboratório de Pesquisas Aplicadas ao Câncer  
LC-CIP Laboratório de Cromatografia  
LDAN-CIP Laboratório de Desenvolvimento de Agroquímicos Naturais, localizado no Centro Integrado de Pesquisa  
MAPK proteína quinase ativada por mitógeno  
MCF-7 câncer de mama humano  
McCoy células não tumorais  
MDR multirresistência a drogas  
melan-a melanócitos normais murino

MG Minas Gerais

MRP1 proteína 1 de resistência a múltiplas drogas

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NF1 neurofibromatose 1

NRAS homólogo do oncogene viral do neuroblastoma RAS

OMS Organização Mundial da Saúde

OV90 câncer de ovário

OVCAR-8 carcinoma de ovário humano

P-388 macrófago murino

PBS-EDTA solução fosfato salino

PI3K/AKT fosfoinositídeo-3-quinase-proteína quinase B

PMA Phorbol-12-miristato-13-acetato

PTEN homólogo de fosfatase e tensina

RAW 264 macrófagos

RPMI1640 Roswell Park Memorial Institute

rTNF receptores de necrose tumoral

RT tempos de retenção

SF-295 glioblastoma humano

SFB Soro fetal bovino

SK-MEL-28 melanoma maligno humano

SPE semente de *Passiflora edulis*

SPS semente de *Passiflora setacea*

SUS Sistema Único de Saúde

SW480 câncer colorretal humano

TERT transcriptase reversa telomerase

TMCS trimetilclorosilano

TP53 proteína tumoral p53

UFV – CRP Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba

UFV-MG Universidade Federal de Viçosa

UFMG-MG Universidade Federal de Minas Gerais

USP-SP Universidade de São Paulo

UV radiação ultravioleta

VERO epitélio de rim normal de macaco verde africano

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	15
REFERÊNCIAS .....	20
CAPÍTULO 1: ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DOS EXTRATOS DE ACETATO DE ETILA DE <i>Passiflora edulis</i> e <i>Passiflora setacea</i> (PASSIFLORACEAE).....	24
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 Coleta e obtenção dos extratos de <i>Passiflora</i> .....	28
2.2 Cultivo e manutenção das células <i>in vitro</i> .....	30
2.3 Plaqueamento celular.....	31
2.4 Triagem dos extratos de <i>Passiflora</i> em concentração única por ensaio de MTT. 31	
2.5 Análise cromatográfica dos extratos de <i>P. setacea</i> e <i>P. edulis</i> .....	31
2.6 IC <sub>50</sub> e seletividade dos extratos SPE e SPS por ensaio de MTT .....	32
2.7 IC <sub>50</sub> e seletividade dos ácidos graxos presentes nos extratos por ensaio de MTT 33	
2.8 Avaliação da morfologia celular por aquisição de imagens após o tratamento com o IC <sub>50</sub> dos extratos SPE e SPS e do ácido palmítico .....	35
2.9 Avaliação do tipo de morte celular e do ciclo celular por Citometria de Fluxo... 35	
2.10 Análises Estatísticas .....	36
3 RESULTADOS .....	36
3.1 Triagem dos extratos de <i>Passiflora</i> em concentração única por ensaio de MTT. 36	
3.2 Análise cromatográfica dos extratos de <i>P. setacea</i> e <i>P. edulis</i> .....	37
3.3 IC <sub>50</sub> e seletividade dos extratos SPE, SPS e dos ácidos graxos por ensaio de MTT39	
3.4 Avaliação da morfologia celular por aquisição de imagens após o tratamento com o IC <sub>50</sub> dos extratos SPE e SPS e do ácido palmítico .....	53
3.5 Avaliação do tipo de morte celular e do ciclo celular por Citometria de Fluxo... 56	

4 DISCUSSÃO .....	60
5 CONCLUSÃO .....	67
REFERÊNCIAS .....	67
CAPÍTULO 2: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cyanocephalus rugosus</i> e <i>Cantinoa carpinifolia</i> (LAMIACEAE) .. 75	
1 INTRODUÇÃO .....	77
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	79
2.1 Coleta das plantas e extração dos óleos essenciais .....	79
2.2 Composição química dos óleos essenciais de <i>C. rugosus</i> e <i>C. carpinifolia</i> .....	82
2.3 Atividade citotóxica por ensaio de MTT .....	83
2.4 Avaliação da morfologia celular por aquisição de imagens após o tratamento com o IC <sub>50</sub> dos óleos essenciais de <i>C. rugosus</i> e <i>C. carpinifolia</i> .....	84
2.5 Avaliação do tipo de morte celular e do ciclo celular por Citometria de Fluxo ...	85
2.6 Análises estatísticas .....	86
3 RESULTADOS .....	86
3.1 Coleta das plantas e extração dos óleos essenciais .....	86
3.2 Composição química dos óleos essenciais de <i>C. rugosus</i> e <i>C. carpinifolia</i> .....	87
3.3 Atividade citotóxica por ensaio de MTT .....	92
3.4 Avaliação da morfologia celular por aquisição de imagens após o tratamento com o IC <sub>50</sub> dos óleos essenciais de <i>C. rugosus</i> (CR) e <i>C. carpinifolia</i> (CC) .....	105
3.5 Avaliação do tipo de morte celular e do ciclo celular por Citometria de Fluxo .	108
4 DISCUSSÃO .....	111
5 CONCLUSÃO .....	117
CONCLUSÃO GERAL .....	118
REFERÊNCIAS .....	118
APÊNDICE A .....	123

## INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é uma preocupação para a saúde pública por ser uma das três principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) no mundo. Em 2019 o câncer foi a primeira ou segunda causa de morte em 112 de 183 países, seguido por acidente vascular cerebral e doença cardíaca coronária (Bray *et al.* 2021). Sua incidência e mortalidade vêm aumentando a cada ano como resultado de uma combinação de fatores, incluindo o envelhecimento, o crescimento populacional e mudanças associadas ao desenvolvimento socioeconômico (Sung *et al.* 2021). Em países em desenvolvimento foi observada uma transição na ocorrência dos principais tipos de câncer, com declínio daqueles associados a infecções e aumento daqueles associados à hábitos e atitudes vinculadas a urbanização como: alimentação inadequada, sedentarismo, poluição do ar respirável, entre outros (Bray *et al.* 2018).

O câncer é resultado da carcinogênese, um processo multifatorial e sequencial envolvendo a ocorrência de alterações moleculares e celulares divididas nas fases de iniciação, promoção e progressão que, apesar de distintas, estão intimamente conectadas (Ko *et al.* 2017). A iniciação ocorre devido a um processo denominado mutagênese, onde alterações ou mutações ocorrem nos genes de forma espontânea, ou pela exposição a um agente carcinogênico, como a luz ultravioleta (Ko *et al.*, 2017; Minamoto *et al.*, 1999).

Segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) surgirão 704 mil novos casos, no Brasil, no triênio 2023-2025. Dentre os tipos de canceres mais comuns o câncer de pele não melanoma será o mais incidente (220 mil), seguido pelos cânceres de mama (74 mil) e próstata (72 mil), cólon e reto (46 mil), pulmão (32 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2022).

Terceiro colocado da lista, o câncer colorretal tem sua ocorrência facilitada devido a alta taxa de renovação do epitélio intestinal. Ele é uma doença multifatorial resultante do estilo de vida, fatores genéticos e ambientais que se desenvolve lentamente a partir de pólipos adenomatosos ou adenomas. Os principais genes que levam ao desenvolvimento da doença são *APC*, *KRAS* e *TP53*. A deleção de *APC* apresenta papel principal na iniciação, a mutação de *KRAS* ativa a via intracelular de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) continuamente, promovendo a proliferação e a sobrevivência, enquanto a inativação do *TP53* mostrou ser mais relevante para a progressão e invasividade do câncer (Aran *et al.*, 2016; Armaghany *et al.*, 2012).

Já o câncer de pele tipo melanoma, apesar de não aparecer na lista do INCA, é um dos cânceres com maior taxa de mortalidade na atualidade. Derivados das cristas neurais, os melanócitos são células comuns a diversos tecidos e que podem acumular danos por exposição à radiação ultravioleta (UV), originando uma coleção de tumores heterogêneos denominados melanomas. Além do grau de exposição UV, são fatores que diferenciam os tipos de melanomas: o local anatômico de origem, tipo de alteração oncogênica, condições imunes e carga de mutações. As mutações somáticas mais recorrentes nos melanomas afetam genes das principais vias de sinalização que governam a proliferação (*BRAF*, *NRAS* e *NF1*), crescimento e metabolismo (*PTEN* e *KIT*), identidade celular (*ARID2*), resistência à apoptose (*TP53*), controle do ciclo celular (*CDKN2A*), que codifica p16INK4A e p14ARF e longevidade celular (*TERT*) (Shain and Bastian 2016).

Em aproximadamente 60% dos casos, uma mutação de um único loco dos oncogenes *BRAF* ou *NRAS* é o suficiente para ativar a via de sinalização MAPK e acionar a proliferação dos melanócitos. A maioria dos tumores resultantes é benigna e tem seu crescimento limitado pelo controle de senescência realizado pelos genes supressores de tumores, como *CDKN2A*. No entanto, um subconjunto de células pode adquirir alterações moleculares adicionais que contribuem para a perda da função desse gene, além de outros mecanismos que conferem características de invasão, metástase e até resistência aos tratamentos (Jackett and Scolyer 2019).

Diversos pesquisadores têm demonstrado que a aquisição de resistência aos tratamentos, também denominada multirresistência a drogas (MDR), pode estar associada à superexpressão da glicoproteína transmembrana (P-gp), pertencente à família de proteínas de transporte do tipo ABC, incluindo a proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas (MRP1) e a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP/ABCG2). Estas atuam como bombas de efluxo, reduzindo os níveis intracelulares de drogas citotóxicas (Martins-Gomes e Silva 2023). Superar essas resistências requer uma busca permanente de novos agentes antineoplásicos (Kwete *et al.* 2016).

O composto paclitaxel (comercializado como Taxol) foi originalmente obtido da casca da árvore, a *Taxus brevifolia*. É um agente terapêutico empregado no tratamento de cânceres, como: ovário, mama, carcinoma de células não-pequenas de pulmão ou sarcoma de Kaposi. Seu mecanismo de ação se baseia na interrupção do ciclo celular ao interferir na função da tubulina, uma proteína do citoesqueleto. Ele atua estabilizando a formação do fuso e, conseqüentemente ativando o ponto de verificação mitótico, levando a célula a entrar em

apoptose (Weaver and Bement 2014). Outras descobertas quimioterápicas, com base no potencial biológico das plantas, foram a camptotecina (*Camptotheca acuminata*), a vincristina e a vimblastina (*Catharanthus roseus*) (Heinrich and Bremner 2006; Newman and Cragg 2007).

Os compostos naturais são misturas únicas e sua composição é influenciada por fatores como: espécie vegetal, estágio de desenvolvimento, métodos de extração, localização geográfica e tipo de solo (Vel *et al.* 2017). Essa grande diversidade e variabilidade torna desafiador o desenvolvimento de produtos farmacêuticos à base de produtos naturais, uma vez que a pesquisa por tratamentos opera de acordo com o princípio “alvo único, composto único” (Hazekamp *et al.*, 2016). No entanto, a ineficácia de tratamentos usando quimioterápicos com modo de ação único contra doenças multifatoriais e a constante aquisição de resistência pelas células cancerosas embasam a necessidade da descoberta de medicamentos que atuem em múltiplos alvos (Zimmermann *et al.*, 2007).

Amin e colaboradores (2009) citam quatro classes de mecanismos de ação para drogas anticâncer naturais: inibidores da metiltransferase, drogas prejudiciais/pró-oxidantes de DNA, inibidores de histonas desacetilases (HDACi) e disruptores mitóticos, como o Taxol. Também já foi demonstrado que os óleos essenciais têm a capacidade de induzir vias de apoptose intrínsecas e extrínsecas em células cancerosas (Blowman *et al.* 2018).

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um processo fundamental nas células que garante o correto funcionamento de diversos processos como a organogênese, reposição de tecidos, hematopoiese, atrofia de órgãos, resposta inflamatória e eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (Ranganath and Nagashree 2001). Associada a ela estão mudanças morfológicas e bioquímicas, facilitadas por duas vias de sinalização. A via extrínseca é ativada no citoplasma das células pela ligação de ligantes específicos a uma família de receptores de membrana denominados receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Quando ativados tais receptores se ligam a proteínas citosólicas adaptadoras e a moléculas de pró-caspase iniciadora (pró-caspase 8), formando um complexo de sinalização indutora de morte (DISC). Após dimerização e ativação no DISC, essas proteínas caspases executoras *downstream* (como a caspase 3), são recrutadas para induzir a apoptose (Grivicich *et al.* 2007).

Na ativação pela via intrínseca, as proteínas da família Bcl2 efetoras pró-apoptóticas (como as proteínas Bak e Bax) ativadas formam oligômeros na membrana externa mitocondrial, induzindo a liberação de citocromo c e outras proteínas intermembrana para o citosol, que junto

de subunidades da proteína Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) e da pró-caspase-9 formam o complexo apoptossomo. Esse complexo realizará a ativação da caspase-9 (caspase iniciadora), que por sua vez irá ativar a pró-caspase-3 (caspase efetora). Em muitos casos a via extrínseca ativada recruta a via apoptótica intrínseca a fim de amplificar a cascata de caspases e induzir a morte celular. Entre as mudanças morfológicas observadas estão, além da formação dos corpos apoptóticos, a retração da célula, a condensação da cromatina, a perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas e a fragmentação do DNA (Grivicich *et al.* 2007).

Dentre os compostos de origem natural tem-se os óleos essenciais que geralmente possuem odor forte e característico, resultado da elevada concentração de compostos aromáticos. São constituídos por moléculas naturais, complexas, voláteis e odoríferas que são sintetizadas por células secretoras presentes em diversos tecidos e órgãos vegetais tais como: folhas, flores, frutos, sementes, cascas e raízes (Bayala *et al.* 2014). Podem conter de 20 a 60 constituintes diferentes em variadas concentrações, com dois ou três constituintes majoritários (CM) representando de 20-70% da fração disponível (Bakkali *et al.* 2008).

Estudos mostram que nas células eucarióticas, os produtos naturais podem atuar como pro-oxidantes afetando as membranas de organelas, como a mitocôndria (Bakkali *et al.* 2008). Isso pode ter relação com a observação de que constituintes específicos podem aumentar a atividade citotóxica de drogas quimioterápicas, reduzindo a concentração necessária para levar à morte, com menos toxicidade. Em terapia combinada, crisina (40  $\mu$ M), um composto presente na família Passiflora, e cisplatina (5  $\mu$ g / mL) aumentaram consideravelmente a taxa de apoptose das células cancerosas HEPG-2 (câncer de fígado humano) ao estabilizar a expressão do gene *TP53* (Li *et al.* 2015). Ela também aumentou a eficácia terapêutica do docetaxel na concentração de 25  $\mu$ M (Lim *et al.*, 2016) e apresentou propriedade antiangiogênese inibindo a expressão do fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) na linhagem celular DU145 (câncer de próstata humano) (Fu *et al.* 2007). O docetaxel é indicado para diversos cânceres e seu mecanismo de ação consiste em promover a montagem e estabilização dos microtúbulos, evitando sua despolimerização (Cortes e Pazdur 1995).

As famílias Passifloraceae e Lamiaceae possuem destaque entre as plantas medicinais com potencial a ser explorado na busca de compostos anticâncer. O gênero *Hyptis* Jacq, sinônimo botânico dos gêneros *Cyanocephalus* e *Cantinoa*, possui ampla ocorrência na América tropical. No Brasil é o gênero com o maior número de espécies da família Lamiaceae, com 69,5 % de espécies endêmicas, e uma grande diversidade morfológica na Mata Atlântica e Cerrado (Harley e Pastore 2012). Algumas espécies são usadas na medicina popular no

tratamento de infecções de pele, infecções gastrointestinais, câibras e dores (Botrel *et al.* 2010). Possuem compostos aromáticos que já foram relacionados a algumas atividades biológicas incluindo antimicrobiana, citotóxica, inseticida (Kuhnt *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2020), antioxidante e antitumoral (Urban *et al.* 2021). As espécies *Condea tomentosa* (Kingston 1977), *Hyptis capitata* (Yamagishi *et al.*, 1988), *Medusantha martiusii* (de Figueirêdo *et al.* 2018a) *Cantinoa stricta* (Scharf, *et al.*, 2016) e *Cantinoa althaeifolia* (Urban *et al.* 2021) já mostraram atividade contra diferentes células cancerosas e seletividade, comparando essas com células normais.

O índice de seletividade (IS) de um composto é muito importante pois ele indica, além da sua capacidade citotóxica, a taxa de células normais que também serão afetadas. O IS pode ser obtido pela razão (divisão) entre a concentração inibitória de 50 % (IC<sub>50</sub>) de células normais pela concentração de IC<sub>50</sub> das células cancerosas, assim, quanto maior sua ação contra as células de um determinado câncer e, simultaneamente, menor sua ação em células normais, maior será seu potencial de seletividade para o câncer em questão. Resumidamente, o IS indica quantas células cancerosas irão morrer para cada célula normal que também morrerá (Oliveira 2019). Com isso, seletividades acima de 2, são consideradas promissoras na investigação de novos agentes anticâncer (Suffness e Pezzuto, 1990).

A identificação do tipo de morte celular pode ser realizada através da avaliação da fluorescência de marcadores nas células. Células viáveis apresentam o lipídeo fosfatidilserina exclusivamente na face citosólica da bicamada lipídica. Quando acionada a morte celular por apoptose, ocorre a perda da assimetria da membrana com a exposição do fosfatidilserina em sua face não citosólica, tornando possível a interação entre a proteína Anexina V e o fosfatidilserina, quando em presença de cálcio. A contagem desses eventos é possível em função da detecção do fluoróforo FITC pelo citômetro de fluxo. O iodeto de propídeo também é uma molécula fluorescente que se liga ao DNA, porém para que essa ligação ocorra, a membrana plasmática da célula deve ter sido rompida ou o potencial de membrana deve ter sido perdido (Schutte *et al.* 1998).

Assim, células marcadas com Anexina V – FITC, porém não marcadas com iodeto, são consideradas como células em apoptose precoce ou inicial. Células marcadas com anexina V e o iodeto estão em apoptose, propriamente dita, após a perda do potencial de membrana. E as células que foram marcadas apenas com iodeto passaram por outro processo de morte celular, a necrose, com a ruptura da membrana celular. As células sem nenhuma marcação são as células viáveis (Schutte *et al.* 1998).

Considerando o exposto, nosso objetivo foi estudar a influência, *in vitro*, de extratos de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* e de óleos essenciais de duas espécies da família Lamiaceae, *Cyanocephalus rugosus* e *Cantinoa carpinifolia* na viabilidade de células cancerosas e não cancerosas. O trabalho foi dividido em 2 capítulos sendo o capítulo 1 dedicado a avaliação do potencial anticâncer de extratos de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* e o capítulo 2 dedicado a avaliação do potencial anticâncer dos óleos essenciais de *Cyanocephalus rugosus* e *Cantinoa carpinifolia*.

## REFERÊNCIAS

- Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R (2009) **Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs**. Int J Biomed Sci 5:1–11
- Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG (2016) **Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality**. Clin Colorectal Cancer 15:195–203. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.02.008>
- Armaghany, Tannaz; Wilson, Jon D; Chu, Quyen; Mills G (2012) **Genetic Alterations in Colorectal Cancer**. Gastrointest Cancer Res 5:19–27. [https://doi.org/10.1007/978-0-85729-984-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-85729-984-0_2)
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) **Biological effects of essential oils - A review**. Food Chem Toxicol 46:446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bayala B, Bassole IHN, Scifo R, et al (2014) **Anticancer activity of essential oils and their chemical components - A review**. Am J Cancer Res 4:591–607
- Blowman K, Magalhães M, Lemos MFL, et al (2018) **Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products**. Evidence-based Complement Altern Med 2018:. <https://doi.org/10.1155/2018/3149362>
- Botrel PP, Pinto JEBP, Ferraz V, et al (2010) **Teor e composição química do óleo essencial de Hyptis marrubioides Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade**. Acta Sci - Agron 32:533–538. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.3415>
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al (2018) **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. CA Cancer J Clin 68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I (2021) **The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide**. Cancer. 127: 3029-3030. <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>
- Cortes JE, Pazdur R (1995) **Docetaxel**. J Clin Oncol 13:2643–2655.

<https://doi.org/10.1200/JCO.1995.13.10.2643>

de Figueirêdo FRSDN, Bitu Primo AJ, Monteiro ÁB, et al (2018a) **Avaliação da atividade moduladora e citotóxica do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* benth.** Rev Ciencias la Salud 16:49–58. <https://doi.org/10.12804/revistas.urosario.edu.co/revsalud/a.6489>

Fu B, Xue J, Li Z, et al (2007) **Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  through reducing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stability and inhibiting its protein synthesis.** Mol Cancer Ther 6:220–226. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0526>

Grivicich I, Regner A, Rocha AB da (2007) **Morte Celular por Apoptose.** Rev Bras Cancerol 53:335–343. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2007v53n3.1801>

Harley RM, Pastore JFB (2012) **A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence.** Phytotaxa 58:1–55. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.58.1.1>

Hazekamp A, Tejkalová K, Papadimitriou S (2016) **Cannabis: From Cultivar to Chemovar II - A Metabolomics Approach to Cannabis Classification.** Cannabis Cannabinoid Res 1:202–215. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0017>

Heinrich M, Bremner P (2006) **Ethnobotany and Ethnopharmacy - Their Role for Anti-Cancer Drug Development.** Curr Drug Targets 7:239–245. <https://doi.org/10.2174/138945006776054988>

INCA (2022) **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer.** Rio de Janeiro : INCA, 2022. 160p. In: Portal INCA

Jackett LA, Scolyer RA (2019) **A review of key biological and molecular events underpinning transformation of melanocytes to primary and metastatic melanoma.** Cancers (Basel) 11:. <https://doi.org/10.3390/cancers11122041>

Kingston DGI, RMM, ZW V. (1977) **Plant anticancer agents. Constituents of *Hyptis tomentosa*.** J Pharm Sci 66:496–499

Ko J, Sethi G, Um J, et al (2017) **The Role of Resveratrol in Cancer Therapy.** Int J Mol Sci 18:1–36. <https://doi.org/10.3390/ijms18122589>

Kuete V, Dzotam JK, Voukeng IK, et al (2016) **Cytotoxicity of methanol extracts of *Annona muricata*, *Passiflora edulis* and nine other Cameroonian medicinal plants towards multi-factorial drug-resistant cancer cell lines.** Springerplus 5:. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3361-4>

Kuhnt, Michaela; Pröbstle, Andrea; Bauer Rudolf; Heinrich M (1995) **Biological and Pharmacological Activities and Further Constituents of *Hyptis verticillata*.** Planta Med 61:227–232

Li R, Tang G, Liu X, et al (2020) **An ethnopharmacological review of *Hyptis suaveolens* (**

L .) Poit. Trop J Pharm Res 19:1541–1550

Li X, Huang J, Wang J, et al (2015) **Chemico-Biological Interactions Combination of chrysin and cisplatin promotes the apoptosis of Hep G2 cells by up-regulating p53**. Chem Biol Interact 232:12–20. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.03.003>

Lim, Hyun-Kyung; Kim, Kyoung Mee; Jeong, Seong-Yun; Choi, Eun Kyung; Jung J (2016) **Chrysin Increases the Therapeutic Efficacy of Docetaxel and Mitigates Docetaxel-Induced Edema**. Integr Cancer Ther 1–9. <https://doi.org/10.1177/1534735416645184>

Martins-Gomes C, Silva AM (2023) **Natural Products as a Tool to Modulate the Activity and Expression of Multidrug Resistance Proteins of Intestinal Barrier**. J Xenobiot 13:172-192. [10.3390/jox13020014](https://doi.org/10.3390/jox13020014)

Minamoto T, Mai M, Ronai Z (1999) **Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis**. Carcinogenesis 20:519–527

Newman DJ, Cragg GM (2007) **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years**. J Nat Prod 70:461–477. <https://doi.org/10.1021/np068054v>

Oliveira MABRE (2019) **Avaliação da atividade antitumoral in vitro do derivado de dibenzoilmetano, 1-[(4'-iso-propil)fenil]-2-propano-3-fenil-1,3- propanodiona (ip2-dbm), em linhagens de melanoma, glioma e adenocarcinoma do colorretal**

Scharf DR, Simionatto EL, Carvalho JE, et al (2016) **Chemical Composition and Cytotoxic Activity of the Essential Oils of *Cantinoa stricta* ( Benth .) Harley & J . F . B . Pastore ( Lamiaceae )**. Rec Nat Prod 10:257–261

Schutte B, Nuydens R, Geerts H, Ramaekers F (1998) **Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells**. J Neurosci Methods 86:63–69. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(98\)00147-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(98)00147-2)

Shain AH, Bastian BC (2016) **From melanocytes to melanomas**. Nat Rev 16:345–358. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>

Suffness M, Pezzuto JM. **Assays related to cancer drug discovery**. In: Hostettmann K, editor. Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity. London: Academic Press; 1990. pp. 71–133

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries**. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 71: 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Urban AM, Nadal J, Swiech D, et al (2021) ***Cantinoa althaeifolia* essential oil : chemical composition and biological , antioxidant , antimicrobial , and antitumor activities**. Res Soc Dev 10:1–14

Vel E Van De, Sampers I, Raes K (2017) **A Review on Influencing Factors on the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils**. Crit Rev Food Sci Nutr 0–79. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1371112>

Weaver BA, Bement W (2014) **How Taxol / paclitaxel kills cancer cells**. Perspect CELL Biol Hum Heal 25:2677–2681. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0916>

Yamagishi T, Zhang D-C, Chang J-J, et al (1988) **The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid-a and -b\***. Phytochemistry 27:3213–3216

Zimmermann GR, Lehár, Joseph; Keith CT (2007) **Multi-target therapeutics : when the whole is greater than the sum of the parts**. Drug Discov Today 12:34–42. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.11.008>

## **CAPÍTULO 1: ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DOS EXTRATOS DE ACETATO DE ETILA DE *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea* (PASSIFLORACEAE)**

A família Passifloraceae possui uma grande diversidade natural, sobretudo no Brasil. Diversas espécies já foram relatadas como fonte de promissores compostos bioativos contra diferentes células cancerosas. O objetivo deste foi avaliar o potencial anticâncer de extratos de *Passiflora edulis* (SPE) e *Passiflora setacea* (SPS), coletadas no Cerrado (MG), sobretudo os extratos de suas sementes, além de avaliar sua composição química. A partir da análise química foram selecionados compostos majoritários que também tiveram seu potencial anticâncer avaliado de forma comparativa. Os extratos foram obtidos por extração líquido-líquido com o solvente acetato de etila e a composição dos mesmos avaliada por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG / EM), após o emprego de técnicas de derivatização nos extratos. A atividade citotóxica foi avaliada em linhagens celulares de melanoma murino (B16F10), câncer de mama murino (4T1), melanócitos normais murino (melan-a), epitélio de rim normal de macaco verde africano (VERO) e câncer colorretal humano (SW480), através de ensaio de MTT. Foram calculados, a partir regressão não linear, os valores de IC<sub>50</sub>, IC<sub>10</sub>, IC<sub>90</sub> e o índice de seletividade (IS) dos extratos SPE e SPS e dos ácidos graxos ÁO (ácido oleico) e ÁP (ácido palmítico). De acordo com as técnicas de derivatização, nos extratos SPE e SPS foram identificados apenas ácidos graxos, sendo que o ácido linoléico foi o composto majoritário em ambos, com maiores concentrações em SPE (74,35 %) quando comparado a SPS (64,75 %). Em geral os extratos afetaram mais as células cancerosas do que as células normais. A seletividade de SPE para B16F10 ficou em 0,64 enquanto SPS exibiu seletividade de 2,64. E para SW480 a seletividade de SPE chegou a 10,91 enquanto SPS exibiu seletividade de 8,03. O ÁP exibiu seletividade de 2,19 para 4T1. O tipo de morte celular desencadeado pelo extrato SPS nas células B16F10 foi a apoptose e para SW480 foi observado um acúmulo de células na fase G2-M associado a um aumento de DNA fragmentado e células vacuolizadas. Nas células 4T1 o ÁP também levou ao acúmulo de células em G2-M e aumento de fragmentação do DNA. Esses achados indicam que os extratos de sementes de *P. edulis* e *P. setacea*, ricos em ácidos graxos, possuem atividade anticâncer com seletividades promissoras, contra essas linhagens *in vitro*, e podem ser considerados na busca de novos fármacos citotóxicos.

**Palavras-chave:** 4T1. B16F10. Câncer. Cerrado. Maracujá. MTT. SW480.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é apontado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um importante problema de saúde pública mundial, especialmente entre os países em desenvolvimento (INCA, 2022). Com base nas estimativas produzidas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer, ocorreram no mundo 18 milhões de novos casos em 2018 e 9,6 milhões de óbitos (Bray *et al.* 2018). Para o Brasil, a estimativa mais recente aponta que surgirão 704 mil novos casos anuais, no triênio 2023-2025. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (220 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (74 e 72 mil, respectivamente), cólon e reto (46 mil), pulmão (32 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2022).

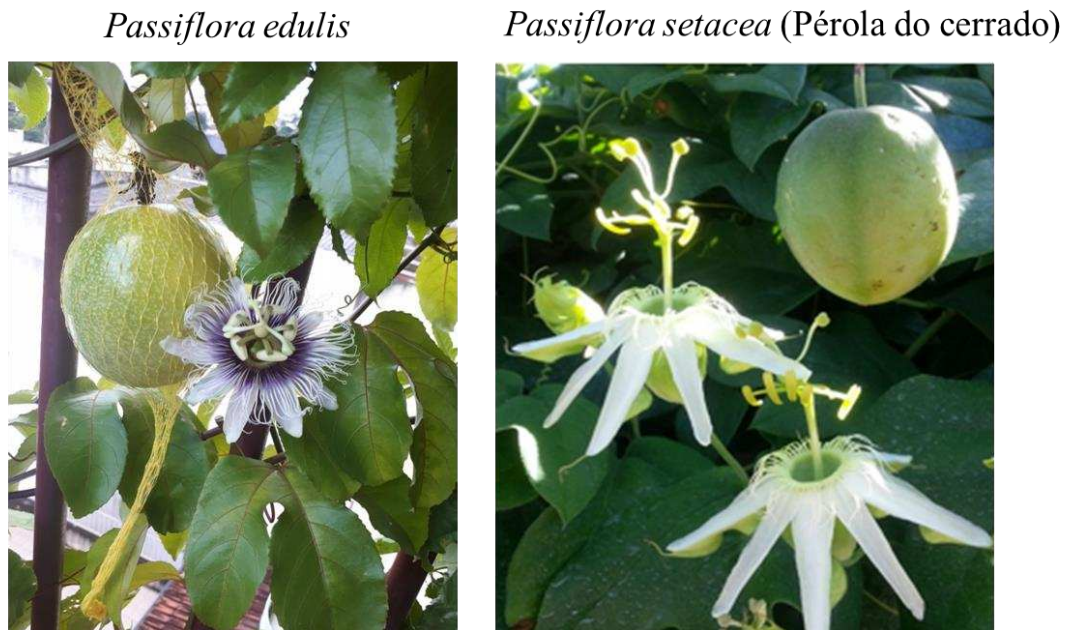
Os cânceres apresentam como principais características a capacidade de subverter a morte celular, manter a sinalização proliferativa e evitar a ação de moléculas ou substâncias supressoras de tumor (Amin *et al.* 2009). Com isso, as estratégias terapêuticas mais utilizadas estão focadas em induzir a apoptose e/ou interromper o ciclo celular (Blowman *et al.* 2018) através de agentes capazes de interagir ou intercalar com o DNA (Lui *et al.* 2007). A utilização de fármacos com mecanismos de ação semelhantes no tratamento do câncer favorece o desenvolvimento de resistência por seleção (Denipote *et al.* 2010).

Outro fator preocupante são as seletividades, menores ou iguais a 1, dos quimioterápicos utilizados no Sistema Único de Saúde (SUS), como Cisplatina, Doxorubicina e Dacarbazina (Nascimento *et al.* 2018; Oliveira 2019; Baeta *et al.* 2021). Quando eficaz, a quimioterapia é acompanhada por efeitos colaterais nocivos ao organismo do paciente. No entanto, plantas e produtos derivados destas, são boas alternativas pois são, em geral, mais simples, ecologicamente corretos, de baixo custo, de rápida obtenção e menos tóxicos, quando comparados aos quimioterápicos convencionais (Iqbal *et al.* 2017). Como exemplo, os compostos isolados do extrato hidroalcolólico de folhas de *Passiflora mucronata*,  $\beta$ -amirina (triterpeno),  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol (fitosteróis), que apresentaram seletividades de 10,9; 12,3 e 12,5; respectivamente, contra células de leucemia mieloide crônica (K562) (da Silva *et al.* 2020).

A família Passifloraceae possui uma grande diversidade natural com 17 gêneros e 650 espécies, grande parte pertencente ao gênero *Passiflora*. Aproximadamente 500 espécies ocorrem na América, 145 no Brasil, tornando-o um centro de diversidade da família com 83 espécies endêmicas (Bernacci *et al.* 2013). *Passiflora edulis* Sims (Figura 1), popularmente

conhecido como maracujá amarelo, é a espécie mais comum nos pomares brasileiros (Meletti 1998), possui mais de 110 tipos de constituintes químicos isolados e identificados, como flavonoides, triterpenoides, ácidos graxos e carotenoides. E já teve diversas atividades biológicas descritas, especialmente, antiproliferativa, antioxidante e anti-inflamatória (Dhawan *et al.* 2004; Storz 2005; He *et al.* 2020).

Figura 1 – Flores e frutos de *Passiflora edulis* e *Passiflora setacea*.



Fontes: A autora e Ana Maria Costa (2016).

O extrato etanólico de sementes de *Passiflora edulis* utilizando fluído supercrítico mostraram atividade antitumoral contra o câncer de mama (MCF-7) ( $EC_{50}$  de  $264,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) após 72h e inibiram em 48,5 % o crescimento do tumor (carcinoma ascítico de Ehrlich - EAC) em camundongos Balb/c na concentração de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ . O mecanismo de ação proposto envolve a oxidação de lipídios e proteínas, aumento da atividade do ciclo redox da glutathione, diminuição da atividade da tioredoxina redutase e indução de dano oxidativo ao DNA, com interrupção do ciclo G2/M e aumento de 48,2 % de células apoptóticas na linhagem EAC. Os danos lipídicos, protéicos e de DNA foram associados a presença de ácidos graxos de cadeia média e longa como o ácido láurico (Mota *et al.* 2018). Extratos de sementes obtidos com 80 % de etanol também exibiram bons resultados inibindo a melanogênese (síntese da melanina em células de melanona humano) e estimulando a síntese de colágeno (em fibroblastos cultivados). Resultados, esses, relacionados a presença de polifenóis, especialmente o piceatannol (Matsui *et al.* 2010). Além de sementes, outros subprodutos agroindustriais como

cascas, folhas e caules de espécies frutíferas se destacam como uma valiosa fonte de compostos naturais bioativos (Martínez *et al.* 2012; Garcia-Garcia *et al.* 2019).

As ações antioxidante e antiinflamatória dos produtos naturais (Costa *et al.* 2015) podem contribuir no tratamento de cânceres como o melanoma e o colorretal. O efeito prejudicial do aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos melanócitos danificados pela radiação UV (Yasui and Sakurai 2003) pode ser minimizado por agentes antioxidantes. Enquanto a ação antiinflamatória é bem-vinda no tratamento do câncer colorretal, visto que, entre os fatores de risco estão: histórico genético familiar, colite ulcerativa de longo prazo e pólipos colônicos (Ma *et al.* 2019).

A espécie *Passiflora setacea* DC (Figura 1), popularmente conhecida como maracujazeiro-sururuca ou maracujazeiro-do-sono, ocorre nos biomas Cerrado, Caatinga e em áreas de transição como o semi-árido mineiro (Brasil) (Ataíde *et al.* 2012). Apresenta grande potencial para consumo *in natura*, em função do sabor adocicado de sua polpa, além de possuir propriedades tranquilizantes (Sanchez *et al.* 2020) e antioxidantes (Santana *et al.* 2015). O extrato etanólico das folhas de *P. setacea* (50 µg mL<sup>-1</sup>) exibiu citotoxicidade contra células SF-295 (glioblastoma humano) e estimulou o crescimento de OVCAR-8 (carcinoma de ovário humano) e HT-116 (câncer de colón humano) (Amaral *et al.* 2019). O efeito agudo do consumo do suco de *P. setacea* foi testado em humanos e, Duarte e colaboradores (2020) observaram efeitos metabólicos benéficos, além da expressão diferenciada de genes envolvidos em processos como inflamação e adesão celular.

Diversas espécies de *Passiflora* foram investigadas frente a sua atividade antitumoral, com destaque para a espécie *P. edulis* (Rowe *et al.* 2004; Thu *et al.* 2010; Silva *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013; Lourith and Kanlayavattanakul 2013; Kuete *et al.* 2016; Hong *et al.* 2017; Ramírez *et al.* 2017; Mota *et al.* 2018; Yamamoto *et al.* 2019; Ramirez *et al.* 2019; Sabino *et al.* 2020; de Sousa *et al.* 2020; Kido *et al.* 2020), *P. alata* (Ozarowski *et al.* 2018; Amaral *et al.* 2019, 2020), *P. mucronata* (da Silva *et al.* 2018, 2020; Amaral *et al.* 2019), *P. incarnata* (Sujana *et al.* 2012; Ma *et al.* 2014; Ozarowski *et al.* 2018), *P. tetrandra* (Perry *et al.* 1991), *P. foetida* (Moongkarndi *et al.* 2004; Arung *et al.* 2009; Ampasavate *et al.* 2010; Dheeban Shankar *et al.* 2017), *P. molissima* (Ballesteros-Vivas *et al.* 2020), *P. ligularis* (Carraz *et al.* 2015), *P. quadrangularis* (Rivas-Mena *et al.* 2015; Amaral *et al.* 2019), *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. mallacophyla*, *P. morifolia*, *P. racemosa*, *P. setacea*, *P. suberosa*, *P. tenuifila*, *P. vitifolia* (Amaral *et al.* 2019), *P. acuminata* (Suffredini *et al.* 2006), *P. tripartita*

(Kumar *et al.* 2015). Além de espécies da família Passifloraceae, incluindo *Adenia lanceolata* e *Adenia stenodactyla* (Stirpe *et al.* 2007).

Considerando o exposto, nossos objetivos foram selecionar extratos de *P. edulis* e *P. setacea* com baixa toxicidade para células normais; analisar cromatograficamente os extratos de sementes das *Passifloras*; avaliar os seus efeitos desses na viabilidade celular das linhagens normais melan-a, VERO e BGM e cancerosas B16F10, 4T1 e SW480 através de ensaios de MTT, e calcular, com base na curva de dose-resposta, a concentração inibitória de 50 % das células (IC<sub>50</sub>) e o índice de seletividade dos extratos. Os ácidos graxos identificados nos extratos também tiveram seus efeitos celulares avaliados visando comparar o resultado dos compostos isolados com o extrato bruto para melhor compreensão do potencial anticâncer. Além de investigar, por citometria de fluxo, o tipo de morte, os efeitos no ciclo celular e as mudanças morfológicas dos tratamentos com seletividades superiores a 2.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e obtenção dos extratos de *Passiflora*

Entre julho e agosto de 2020 foram coletados frutos e folhas de *Passiflora edulis* Sims f. Flavicarpa Degener e *Passiflora setacea* (cultivar BRS Pérola do Cerrado), cultivadas na cidade de Rio Paranaíba, (Cerrado Mineiro). As amostras coletadas faziam parte de plantações já estabelecidas na cidade. O material foi processado no Laboratório de Desenvolvimento de Agroquímicos Naturais da UFV – CRP (Universidade Federal de Viçosa – Campus de Rio Paranaíba).

Folhas, sementes e cascas foram secas em temperatura ambiente durante 7 dias e trituradas por turbólise com o auxílio de um liquidificador. Para obtenção dos extratos foi empregado o método de extração por maceração, com o solvente acetato de etila, sob agitação (Figura 2). Foram realizadas 3 renovações de solvente a cada 24 horas, e após isso, os extratos foram filtrados, concentrados com a evaporação rotativa, em baixa pressão, e armazenados protegidos da luz em refrigeração à -2 °C.

Figura 2 - Obtenção dos extratos de *Passiflora* por maceração com agitação em mesa agitadora tipo shaker (a) e filtração (b)



Fonte: A autora.

A quantidade de material vegetal, solvente utilizado e rendimento dos extratos é apresentada na Tabela 1. Os extratos foram identificados seguindo: CPS– Casca de *Passiflora setacea*, FPS – Folha de *Passiflora setacea*, SPE – Semente de *Passiflora edulis*, CPE – Casca de *Passiflora edulis*, SPS – Semente de *Passiflora setacea*.

Tabela 1 - Obtenção e rendimento dos extratos de *P. edulis* e *P. setacea*

Extratos	Peso do material em pó (g) (PMP)	Volume total de solvente (mL)	Peso do extrato bruto seco (g) (PEBS)	Rendimento (%) (PEBS/PMP)
CPS	40	300	0,39	0,99
FPS	30	300	0,79	2,63
SPE	40	300	10,70	26,75
CPE	40	300	0,38	0,96
SPS	40	300	14,26	35,64

CPS (Casca de *Passiflora setacea*), FPS (Folhas de *Passiflora setacea*), SPE (Sementes de *Passiflora edulis*), CPE (Casca de *Passiflora edulis*), SPS (Sementes de *Passiflora setacea*). Fonte: A autora.

## 2.2 Cultivo e manutenção das células *in vitro*

As linhagens aderentes melan-a, cedida pelo Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade de São Paulo (USP-SP), B16F10 cedida pela prof<sup>a</sup>. Mirian T. Paes Lopes do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-MG), 4T1, VERO, BGM e SW480, cedidas pelo prof. Gustavo Costa Bressan do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV-MG) e MCF-7 adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) foram mantidas em frascos de cultura de poliestireno com os respectivos meios de cultura (Sigma-Aldrich®) indicados na Tabela 2. Foram utilizados 2 agentes antimicrobianos, a 1 % cada, (ampicilina e streptomina) (Sigma-Aldrich®) e os frascos foram incubados em estufa em condições padrão (37 ° C com atmosfera úmida (95 %) e 5 % de CO<sub>2</sub>) até a confluência das células.

Tabela 2 - Linhagens celulares, origens e respectivos meios de cultivo utilizados

Linhagem	Especificação	Meio de cultura	Observação
VERO	Epitélio de rim normal de macaco verde africano	DMEM e 10 % SFB	
BGM	Epitélio normal de macaco verde africano	DMEM e 10 % SFB	
MELAN-A	Melanócitos normais murinos	RPMI1640 e 10 % SFB	0,1 % de fator de crescimento PMA
SW480	Câncer colorretal humano	½ DMEM, ½ RPMI e 10 % SFB	
MCF-7	Câncer de mama humano	RPMI com 10 % SFB	0,1% de insulina
BGM	Epitélio normal de macaco verde africano	DMEM e 10 % SFB	
B16F10	Melanoma murino	DMEM e 10 %SFB	
4T1	Câncer de mama murino	RPMI e 10 % SFB	

DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium); RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute); PMA (Phorbol-12-miristato-13-acetato); Meio completo: após adição de SFB (Gibco®) (Soro fetal bovino). Fonte: A autora.

### 2.3 Plaqueamento celular

Após a confluência, as linhagens foram lavadas com PBS-EDTA (solução fosfato salino), tripsinizadas (Sigma-Aldrich®) e ressuspensas em meio completo para contagem na câmara de *Neubauer*. No plaqueamento foram semeadas  $1 \times 10^4$  células em 100  $\mu\text{L}$  de meio completo, em cada poço das placas de 96 poços. Estas foram incubadas em estufa, sob condições padrão, por 24h para aderência.

### 2.4 Triagem dos extratos de *Passiflora* em concentração única por ensaio de MTT

Após aderência da linhagem melan-a, os extratos diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO 0,5 %) (Sigma-Aldrich®) foram incorporados em meio completo e cada poço com células recebeu alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  da solução na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , segundo Amaral *et al.* (2019). As células foram novamente incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  durante 48h e 60h. Posteriormente, os tratamentos foram substituídos por 50  $\mu\text{l}$  de solução de meio contendo 10 % de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio) (0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  - Sigma-Aldrich®) e as placas foram incubadas novamente por 3 horas, protegidas da luz. Após esse período o MTT foi substituído por 50  $\mu\text{l}$  de DMSO, por poço, para dissolver os cristais de formazan sintetizados nas células viáveis pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Kumar *et al.* 2018). A absorbância das placas foi medida utilizando um espectrofotômetro (SpectraMax®) a 570 nm. Poços com células tratadas com meio completo contendo DMSO 0,5% foram utilizadas como controle negativo e poços sem células como branco durante a leitura da absorbância.

A porcentagem de células vivas representa a viabilidade celular e foi calculada utilizando os dados de absorbância (Abs) conforme a equação:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{média Abs tratamento}}{\text{média Abs controle negativo}} \times 100$$

### 2.5 Análise cromatográfica dos extratos de *P. setacea* e *P. edulis*

Levando em consideração o menor efeito na viabilidade de melan-a e o alto rendimento, os extratos SPE e SPS foram selecionados para investigação da sua composição química. Antecedendo a análise em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM)

foram utilizados dois processos de derivatização visando melhorar as condições cromatográficas: esterificação e sililação.

A conversão em ésteres metílicos foi obtida pelo tratamento de 20 mg de cada extrato, solubilizado em 2 mL de n-hexano, com 0,1 mL de solução metanólica de KOH a  $2 \text{ molL}^{-1}$ . A mistura foi agitada em aparelho tipo Vortex por 10 minutos, em seguida, foram adicionados 2 mL de solução saturada de NaCl. Após repouso, a fase orgânica foi recolhida para a análise (Rabello *et al.* 2017).

A trimetilsililação dos prótons ácidos, para elevar a volatilidade dos metabólitos, foi realizada pela mistura de 20 mg de extrato, com 40  $\mu\text{L}$  de solução de cloridrato de metoxiamina ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$  em piridina), seguida de aquecimento até  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura mantida por 30 minutos. No mesmo frasco, sem resfriar, foram adicionados 160  $\mu\text{L}$  de solução de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1 % de trimetilclorosilano (TMCS). O aquecimento foi mantido por mais 30 minutos e depois a amostra foi transferida para a análise (Das *et al.* 2016).

As condições cromatográficas empregadas foram injeção de 1  $\mu\text{L}$  na concentração de 0,1% dos extratos, empregando temperatura do forno programada inicialmente a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 2 minutos, com elevação de  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  por minuto até atingir  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ , permanecendo por 7 minutos, seguido de elevação de  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  por minuto até  $260 \text{ }^\circ\text{C}$ , mantidos por 30 minutos, nova taxa aquecimento de  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  por minuto foi utilizada até  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ , mantidos por 10 minutos. A temperatura do injetor foi de  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ , do detector foi  $240 \text{ }^\circ\text{C}$  e foi empregada razão split 1:10. A identificação dos componentes foi realizada através dos tempos de retenção (RT) e pela comparação dos espectros de massa com a biblioteca de espectros de massa Wiley 6.0 (EUA). A quantificação dos constituintes foi realizada a partir dos perfis do cromatograma utilizando áreas relativas dos picos (%) (Rabello *et al.* 2017).

## **2.6 IC<sub>50</sub> e seletividade dos extratos SPE e SPS por ensaio de MTT**

Os tratamentos que se mostraram promissores na triagem de concentração única foram repetidos para todas as linhagens (melan-a, B16F10, 4T1, VERO, BGM e SW480) e avaliados por MTT após 48h de exposição, conforme descrito acima. Nesses foram utilizadas as concentrações 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para calcular o IC<sub>50</sub> e o índice de seletividade, com exceções nas linhagens VERO e BGM, para as quais foi adicionada a concentração de 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e B16F10, onde foram utilizadas as concentrações 23,43; 46,87;

93,75; 187,5; 375; 750 e 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O acréscimo das concentrações ocorreu visando melhorar o cálculo do  $\text{IC}_{50}$ .

A concentração inibitória de 50% das células ( $\text{IC}_{50}$ ) foi calculada para cada extrato por meio de regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas), utilizando os programas GraphPad Prism® 5.0 e Microsoft Office Excel 2013®. O índice de seletividade foi calculado utilizando os resultados obtidos de  $\text{IC}_{50}$  em células cancerosas e células normais, conforme:

$$\text{Índice de seletividade} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ linhagem normal}}{\text{IC}_{50} \text{ linhagem cancerosa}}$$

Através dos valores de Log  $\text{IC}_{50}$  e HillSlope obtidos com a porcentagem de células vivas foram calculadas as concentrações inibitórias de 10 % ( $\text{IC}_{10}$ ), com 90 % de viabilidade, e de 90 % das células ( $\text{IC}_{90}$ ), com 10 % de viabilidade, seguindo:

$$\text{Log IC}_{10} = \frac{\text{Log IC}_{50} - 1}{\text{HillSlope} * (\text{Log } 90 \left( \frac{100}{90 - 1} \right))}$$

$$\text{Log IC}_{90} = \frac{\text{Log IC}_{50} - 1}{\text{HillSlope} * (\text{Log } 10 \left( \frac{100}{10 - 1} \right))}$$

Também foram calculadas as seletividades dos compostos considerando o  $\text{IC}_{10}$  e o  $\text{IC}_{90}$ .

## 2.7 $\text{IC}_{50}$ e seletividade dos ácidos graxos presentes nos extratos por ensaio de MTT

Com base nos ácidos graxos identificados por CG-EM e na disponibilidade de acesso desses na UFV, foram selecionados os ácidos oleico e palmítico (Figura 3) para serem testados de forma isolada, nas mesmas condições que os extratos SPE e SPS, com o objetivo de comparar seus efeitos puros contra os efeitos obtidos dos extratos de acetato de etila. Para isso, foram obtidos, através de doação, os ácidos palmítico (ácido hexadecanóico, saturado, peso molecular: 256.43) e oleico (ácido cis-9-octadecenóico, monoinsaturado, peso molecular: 282.46) de grau analítico com pureza superior a 99 % (Sigma-Aldrich®).

Figura 3 - Fórmulas estruturais do ácido oleico e ácido palmítico



Fonte: A autora.

As concentrações de estudo foram definidas com base nos percentuais dos ácidos graxos identificados nos extratos SPE e SPS pelo método de sililação e na maior concentração utilizada para a criação das regressões não lineares ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

O valor médio de ácido oleico encontrado nos extratos foram respectivamente, SPE e SPS:  $29,01 \% + 23,87 \% = 52,88 / 2 = \mathbf{26,44 \%}$ . Sendo que  $26,44 \%$  de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1} = \mathbf{264,40 \mu\text{g mL}^{-1}}$ . Para iniciar a diluição seriada dobramos a concentração, com isso as concentrações de ácido oleico utilizadas foram: 528,8; **264,4**; 132,2; 66,1; 33,05 e  $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Já o valor médio de ácido palmítico encontrado nos extratos SPE e SPS:  $8,44 \% + 9,07 \% = 17,51 / 2 = \mathbf{8,75 \%}$ . Sendo que  $8,75\%$  de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1} = \mathbf{87,50 \mu\text{g mL}^{-1}}$ . Para iniciar a diluição seriada também dobramos a concentração, com isso as concentrações de ácido palmítico utilizadas foram: 175; **87,5**; 43,75; 21,87; 10,93 e  $5,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A linhagem melan-a não recebeu as menores concentrações de ácido oleico ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ácido palmítico ( $5,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em função do desenho amostral inicial que foi aprimorado ao longo da condução dos experimentos.

A atividade citotóxica dos ácidos graxos foi avaliada por ensaio de MTT, com 48h de tratamento, para os cálculos dos valores de  $IC_{50}$ ,  $IC_{10}$ ,  $IC_{90}$  e dos índices de seletividades com as mesmas linhagens descritas para os extratos brutos (melan-a, B16F10, 4T1, VERO e SW480), com exceção da linhagem BGM. A linhagem de câncer de mama humano (MCF-7) foi adicionada ao estudo com o ácido palmítico após a observação de que o mesmo apresentou seletividade superior a 2 para a linhagem de câncer de mama murino (4T1).

## 2.8 Avaliação da morfologia celular por aquisição de imagens após o tratamento com o IC<sub>50</sub> dos extratos SPE e SPS e do ácido palmítico

Para avaliar a morfologia das células foram utilizadas imagens obtidas com a câmera de um microscópio de luz e fluorescência do tipo Biostation IMq (Nikon®). Os extratos e ácidos graxos que apresentaram seletividades acima de 2 foram selecionados, nas respectivas linhagens, para esse experimento. As células das linhagens SW480 e 4T1 foram plaqueadas a uma concentração de  $1 \times 10^4$  células em placas de 35 mm com fundo de vidro (IBIDI®) e levadas a estufa de cultivo em condições padrão. Após a aderência, as células SW480 foram tratadas com as concentrações de IC<sub>50</sub> calculados:  $208,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  para SPE e  $338,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  para SPS. As células 4T1 receberam tratamento com  $80,41 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido palmítico e as células do controle, de todos os tratamentos, foram tratadas com 0,5 % de DMSO. As placas foram novamente levadas a estufa de cultivo e mantidas até a aquisição das imagens.

As observações foram realizadas após 24 horas de tratamento e as imagens foram obtidas, após varredura aleatória das placas, nas objetivas de 20x, 40x e 80x com tempos de exposição entre 5 e 75 milissegundos, dependendo da objetiva. O ganho e a intensidade de luz branca do microscópio variaram de acordo com o campo observado.

## 2.9 Avaliação do tipo de morte celular e do ciclo celular por Citometria de Fluxo

Os extratos de *Passiflora* e ácidos graxos que apresentaram Índice de Seletividade superiores a 2 foram selecionados para determinação do tipo de morte celular desencadeado. Foram eles: o extrato SPS na linhagem B16F10 (IS = 2,63) e SW480 (IS = 8,03) e o extrato SPE na linhagem SW480 (IS = 10,9). Entre os ácidos graxos, apenas o ácido palmítico foi selecionado na linhagem 4T1 (IS = 2,19).

Em placas de 6 poços foram semeadas cerca de  $1 \times 10^6$  células/poço das linhagens B16F10, SW480 e 4T1. Após a aderência, as células foram tratadas com os valores de IC<sub>90</sub> correspondente a cada tratamento, sendo eles, IC<sub>90</sub> SPS:  $2245,53 \mu\text{g mL}^{-1}$  em B16F10; IC<sub>90</sub> SPS:  $1323,41 \mu\text{g mL}^{-1}$  em SW480; IC<sub>90</sub> SPE:  $1393,29 \mu\text{g mL}^{-1}$  em SW480; IC<sub>90</sub> do Ácido palmítico:  $369,69 \mu\text{g mL}^{-1}$  em 4T1. Decorrido 24 horas de tratamento as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. As células foram divididas em dois lotes para a citometria de fluxo.

Para avaliação da morte celular, as células foram ressuspensas em PBS (1 mL), centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão Hank's contendo NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e NaHCO<sub>3</sub>, preparado segundo AAT Bioquest, Inc©. Novamente as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado, e ressuspensas em 200 µL de Hank's com 5 µL de Anexina V- FITC (ImunoTools®, Friesoythe, NI, Alemanha). Após isso, o material foi transferido para tubos de microcentrífuga (Eppendorf®) e levados a refrigeração até o momento da análise no Citômetro de fluxo BD FACS Verse®. Antes da contagem e análise, foi adicionado 5 µL de solução de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) na concentração estoque de 10 µg mL<sup>-1</sup>. Foram analisados 10000 eventos por amostra.

Para avaliação do ciclo celular, as células foram ressuspensas em álcool etílico 70 % (1 mL) e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado mantendo-se aproximadamente 50 µL de álcool com as células. Essas foram ressuspensas em 200 µL de solução contendo PBS, RNase A (20 mg mL<sup>-1</sup> - Invitrogen®) e iodeto de propídeo (10 µg mL<sup>-1</sup> - Sigma-Aldrich®) e incubadas por 1 hora antes da contagem e análise no Citômetro de fluxo (Zhu *et al.* 2015).

A quantidade de DNA presente em cada célula indica a fase do ciclo celular em que esta se encontra. As fases foram divididas em G0-G1 (Conteúdo de DNA = 2n), S (Conteúdo de DNA dobrando), G2-M (Conteúdo de DNA = 4n) e DNA fragmentado (Conteúdo de DNA menor que 2n).

## **2.10 Análises Estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ordinary one-way e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett à 5 % de significância, utilizando o programa GraphPad Prism®. Foram representados nos gráficos as médias de 3 experimentos independentes com seus respectivos desvios padrões.

## **3 RESULTADOS**

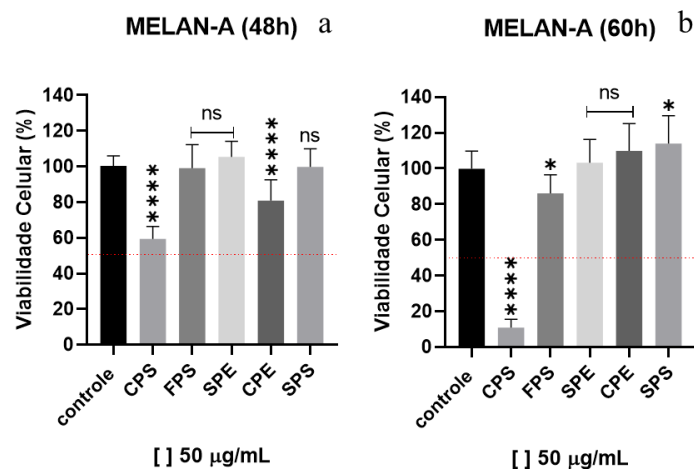
### **3.1 Triagem dos extratos de *Passiflora* em concentração única por ensaio de MTT**

Visando a seleção dos extratos que não comprometessem a viabilidade da linhagem normal, o ensaio de MTT foi realizado em concentração única. A linhagem melan-a recebeu

como tratamento os diferentes extratos de *Passiflora* (CPS – Casca de *Passiflora setacea*, FPS – Folha de *Passiflora setacea*, SPE – Semente de *Passiflora edulis*, CPE – Casca de *Passiflora edulis* e SPS – Semente de *Passiflora setacea*) durante 48 e 60 horas.

A triagem (Figura 4) mostrou que o extrato CPS foi o responsável pela maior redução da viabilidade celular, comparado aos demais tratamentos, e o efeito citotóxico aumentou ao longo do tempo (de 40,9 % de inibição em 48h para 89,04 % após 60h). A viabilidade da linhagem celular quando estas foram tratadas com o extrato FPS não diferiu do controle após 48h, porém com 60h foi observada uma redução discreta de 13,84 %. O extrato SPE não interferiu na viabilidade em ambos os tempos, enquanto o extrato CPE foi ativo após 48h (inibição de 9,45 % na viabilidade) e não ativo após 60h (aumento de 9,96 % na viabilidade). Os extratos SPS e SPE não interferiram na viabilidade celular após 48h, e decorrido o período de 60h a viabilidade foi superior ao controle em 15,06 %. Por esse motivo foram selecionados durante a triagem para avançar nas avaliações de composição química e citotoxicidade.

Figura 4 - Triagem da viabilidade das células melan-a em função de diferentes extratos de *Passiflora* do cerrado, após 48h (5a) e 60h (5b) de tratamento



CPS – Casca de *Passiflora setacea*, FPS – Folha de *Passiflora setacea*, SPE – Semente de *Passiflora edulis*, CPE – Casca de *Passiflora edulis* e SPS – Semente de *Passiflora setacea*. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,99$ ), \* ( $P = 0,02$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

### 3.2 Análise cromatográfica dos extratos de *P. setacea* e *P. edulis*

Os métodos de derivatização empregados forneceram 6 componentes para o extrato de *P. edulis* (SPE) e 4 componentes para o extrato de *P. setacea* (SPS), todos ácidos graxos (Tabela 3). Pelos cromatogramas de SPE foi possível identificá-los em torno de 11,78 e 17,32 min. Na esterificação os minutos 11,78 e 14,79 foram correspondentes aos ácidos palmítico e linoleico,

respectivamente. Ácido palmitoléico e ácido mirísrico foram detectados entre 14,89 e 15,35 min. Já no processo de sililação os ácidos palmítico e linoleico foram detectados entre 13,93 e 16,81 min. E os ácidos oleico e esteárico aos minutos 16,89 e 17,32. Para o extrato de *P. setacea* (SPS) os ácidos graxos foram identificados entre 13,93 e 17,33 minutos. Na esterificação, nos tempo de 11,79 e 14,29 foram identificados palmitato de metila e ácido linoleico, enquanto ácido oleico e estearato de metila foram identificados após 14,89 e 15,35 min. Após o processo de sililação, palmitato de trimetilsilila e ácido linoleico foram identificados entre 13,93 e 16,81 min. E o ácido oleico e estearato de trimetilsilila foram identificados entre 16,83 e 17,33 min. Em relação aos teores das substâncias identificadas, SPE mostrou predominância de ácido linoleico (60,19 – 74,35 %) seguido por ácido palmitoléico (18,99 %) e ácido oleico (29,01 %). SPS também mostrou predominância do ácido linoleico (59,51- 64,75 %) e ácido oleico (23,87- 34,60 %).

Tabela 3 - Composição química dos extratos de sementes de *Passiflora edulis* (SPE) e *Passiflora setacea* (SPS) após os processos de derivatização: esterificação e sililação

Amostra - Derivatização	RT (min)	Substância	Concentração (%)
SPE – ésteres	11,778	Ácido palmítico	4,32
	14,794	<b>Ácido linoleico</b>	<b>74,35</b>
	14,891	<b>Ácido palmitoleico</b>	<b>18,99</b>
	15,348	Ácido mirísrico	2,35
SPE - sililado	13,931	Ácido palmítico	8,44
	16,807	<b>Ácido linoleico</b>	<b>60,19</b>
	16,889	<b>Ácido oleico</b>	<b>29,01</b>
	17,321	Ácido esteárico	2,36
SPS - ésteres	11,791	Palmitato de metila	2,35
	14,293	<b>Ácido linoleico</b>	<b>59,51</b>
	14,891	<b>Ácido oleico</b>	<b>34,60</b>
	15,353	Estearato de metila	3,54
SPS – sililado	13,932	Palmitato de trimetilsilila	9,07
	16,812	<b>Ácido linoleico</b>	<b>64,75</b>
	16,829	<b>Ácido oleico</b>	<b>23,87</b>
	17,331	Estearato de trimetilsilila	2,304

RT: Tempo de retenção da substância. Fonte: A autora.

### 3.3 IC<sub>50</sub> e seletividade dos extratos SPE, SPS e dos ácidos graxos por ensaio de MTT

Conforme os resultados da triagem (Figura 4), foram selecionados os extratos não tóxicos à linhagem celular normal: SPE (Semente de *Passiflora edulis*) e SPS (Semente de *Passiflora setacea*) para serem testados em diferentes concentrações e em diferentes linhagens. Além disso, com base na análise cromatográfica dos extratos e disponibilidade de material dentro da UFV, foram selecionados os ácidos graxos oleico e palmítico para também serem testados. As células melan-a, B16F10, 4T1, VERO, BGM, SW480 e MCF-7 foram tratadas por 48h e as % de células vivas foram avaliadas por ensaio de MTT. A partir da viabilidade celular, foram calculados os valores de IC<sub>50</sub> e a partir dos valores de IC<sub>50</sub> foram calculados os índices de seletividade que se encontram resumidos na Tabela 4. Os dados de BGM não estão na tabela pois foram avaliadas somente com SPE e SPS e MCF-7 apenas com o ácido palmítico.

Os extratos que apresentaram seletividade superior a 2 foram: SPE na linhagem de câncer colorretal (SW480) com IS de 10,91 e SPS nas linhagens SW480 com IS de 8,03 e melanoma (B16F10) com IS de 2,64. Entre os ácidos graxos, apenas o ácido palmítico exibiu seletividade de 2,19 para a linhagem de câncer de mama murino 4T1.

1 Tabela 4 – Concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) (µg mL<sup>-1</sup>) das células e índice de seletividade (IS) dos extratos SPE e SPS e dos ácidos oleico (Á.O.) e palmítico (Á.P.)  
2

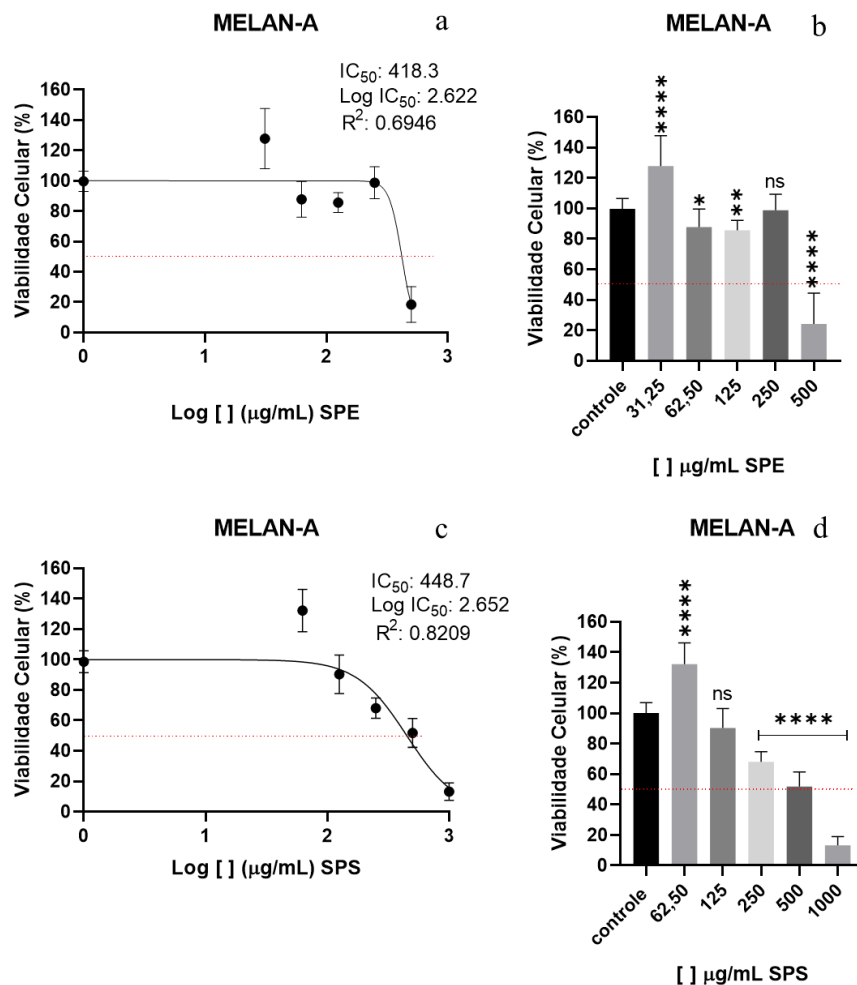
Tratamentos		melan-a	B16F10	4T1	VERO	SW480	IS (MELAN-A /B16F10)	IS (MELAN- A/4T1)	IS (VERO/SW480)
SPE	IC <sub>50</sub>	418,3	482,1	9,9E+09	2280	208,8			
	Log IC <sub>50</sub>	2,62	2,68	9,99	3,35	2,32	0,86	-	10,91
	R <sup>2</sup>	0,69	0,66	0,03	0,73	0,74			
	HillSlope	-8,32	-0,67	-0,14	-0,42	-1,15			
SPS	IC <sub>50</sub>	448,7	170	1145	2718	338,2			
	Log IC <sub>50</sub>	2,65	2,23	3,05	3,43	2,52	2,64	0,39	8,03
	R <sup>2</sup>	0,82	0,84	0,29	0,67	0,81			
	HillSlope	-2,10	-0,85	-	-0,41	-1,61			
Á.O.	IC <sub>50</sub>	158,9	633,5	111,1	126,5	255			
	Log IC <sub>50</sub>	2,20	2,80	2,04	2,10	2,40	0,25	1,43	0,49
	R <sup>2</sup>	0,83	0,79	0,82	0,82	0,84			
	HillSlope	-1,01	-0,77	-4,48	-19,03	-20,82			
Á.P.	IC <sub>50</sub>	35,27	551,1	16,08	30,34	80,41			
	Log IC <sub>50</sub>	1,54	2,74	1,20	1,48	1,90	0,06	2,19	0,37
	R <sup>2</sup>	0,90	0,56	0,81	0,80	0,86			
	HillSlope	-1,13	-17,71	-0,10	-0,93	-2,28			

3 SPE: Extrato da semente de *Passiflora edulis*; SPS: Extrato da semente de *Passiflora setacea*; Á.O.: Ácido oleico; Á.P.: Ácido palmítico; melan-a: célula normal murina;  
4 B16F10: célula de melanoma murina; 4T1: célula de câncer de mama murino; VERO: célula normal primata; SW480: célula câncer colorretal humana; -: valor não calculado  
5 pelo Prism. Fonte: A autora.  
6

Para a linhagem melan-a (Figuras 5a e 5b), a concentração de  $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SPE foi responsável por um aumento de  $28,17 \%$  na viabilidade celular. As concentrações entre  $62,50$  e  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SPE foram responsáveis por reduções de  $11,99$  a  $14,07 \%$  na viabilidade celular. A  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  não foi observada diferença estatística com o controle enquanto a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  a viabilidade reduziu  $75,77 \%$ .

Para o extrato SPS ( $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figuras 5c e 5d) observou-se um aumento de  $32,06 \%$  na viabilidade de melan-a, comparado ao controle. Entre  $250$  e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  de SPS a viabilidade sofreu reduções de  $32,06$  e  $48,25 \%$ , respectivamente. Enquanto em  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  a redução foi de  $86,71 \%$ .

Figura 5 - Viabilidade de melan-a em função da concentração dos extratos (a e b) SPE (Semente de *P. edulis*) e (c e d) SPS (Semente de *P. setacea*), após 48h de tratamento

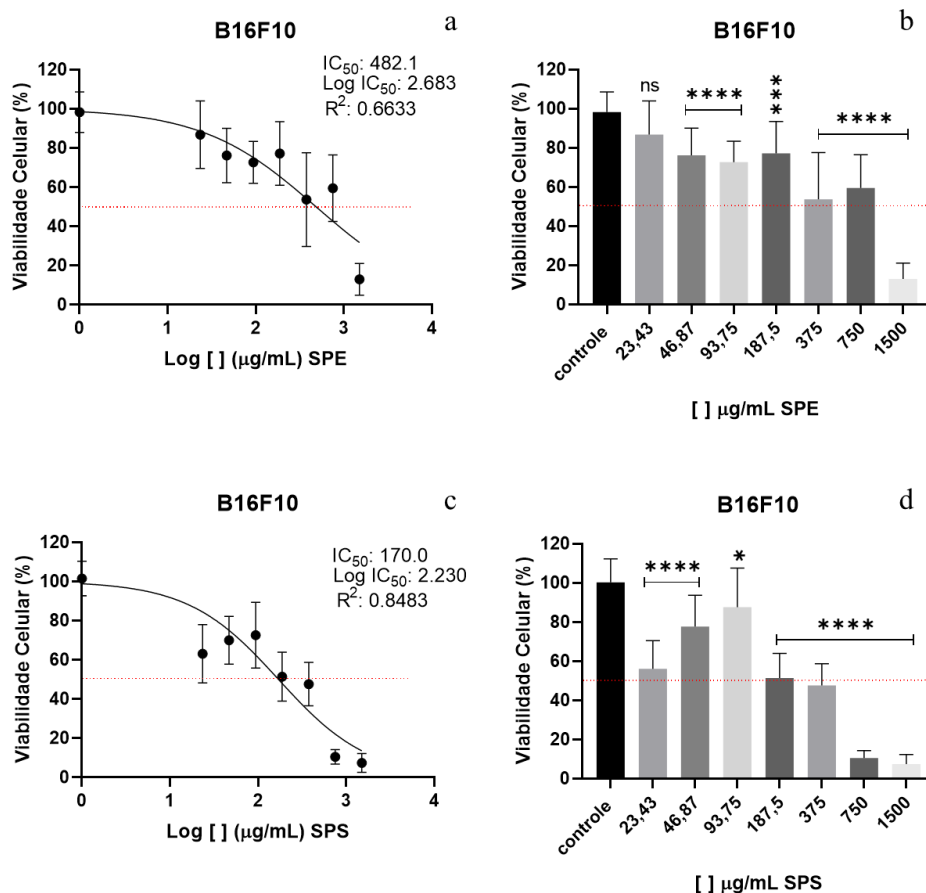


Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 5a e 5c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 5b e 5d: médias submetidas ao teste de Dunnett à  $5\%$  de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,99$ ), \* ( $P = 0,015$ ), \*\* ( $P = 0,006$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ).  
Fonte: A autora.

Durante a realização dos experimentos com a linhagem B16F10 foram observados decréscimos na viabilidade celular em altas e baixas concentrações dos extratos (1000 e 31,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (dados não apresentados). Visando garantir os efeitos observados, escolhemos alterar as concentrações ensaiadas para 1500; 750; 375; 187,5; 93,75; 46,87 e 23,43  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

O extrato SPE em 23,43  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figuras 6a e 6b) reduziu a viabilidade das células B16F10 em 6,01 %, comparado ao controle, e com isso, não diferiu estatisticamente. A maior concentração (1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi responsável por 86,84 % de redução na viabilidade e a 375  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a redução foi de 45,42 %. A concentração responsável por 50 % de inibição, segundo a regressão não linear, foi de 482,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para SPE. O extrato SPS (Figuras 6c e 6d) exibiu redução de 44,14 % da viabilidade na concentração de 23,43  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nas concentrações de 46,87 a 187,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a redução variou de 22,58 a 48,75 % e as concentrações de 750 e 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de SPS reduziram em 89,57 % e 92,63 % a viabilidade de B16F10, respectivamente.

Figura 6 - Viabilidade de B16F10 em função da concentração dos extratos (a e b) SPE (Semente de *P. edulis*) e (c e d) SPS (Semente de *P. setacea*), após 48h de tratamento

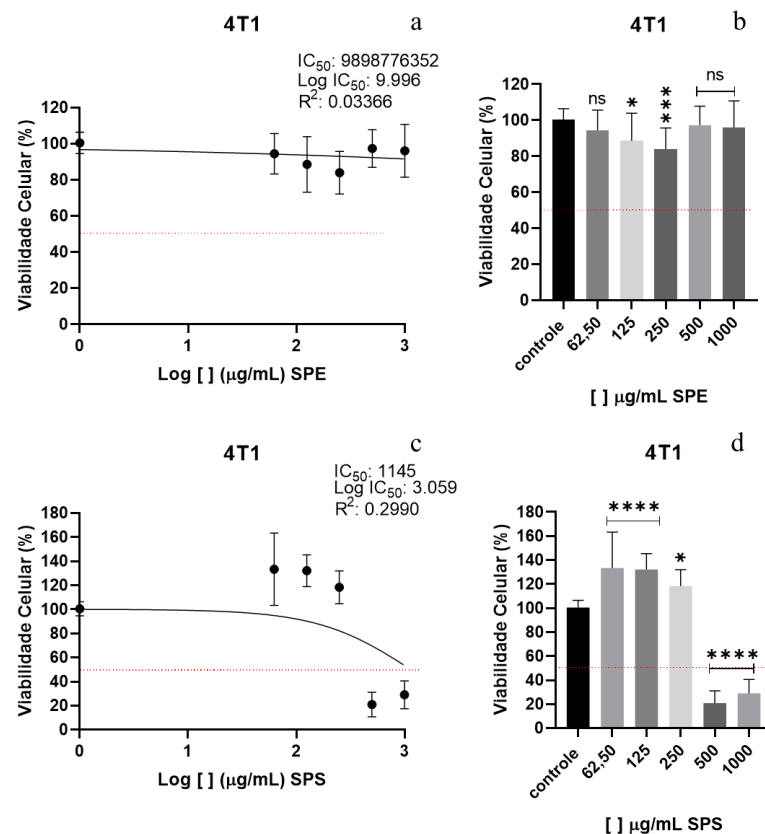


Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 6a e 6c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 6b e 6d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi

representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,14$ ), \* ( $P = 0,041$ ), \*\*\* ( $P = 0,0001$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ).  
Fonte: A autora.

As células 4T1 apresentaram menor viabilidade com o extrato SPE em  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figuras 7a e 7b), com redução de 16,50 %, comparado ao controle. A concentração responsável por 50 % de inibição, segundo a regressão não linear, não foi encontrada. O extrato SPS (Figuras 7c e 7d) em  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  exibiu uma viabilidade 79,23 % menor do que o controle. A maior concentração ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi responsável por 71,15 % de redução na viabilidade e o  $\text{IC}_{50}$  foi estimado em  $1145 \mu\text{g mL}^{-1}$ , porém com um baixo (0,29) coeficiente de determinação da regressão ( $R^2$ ).

Figura 7 - Viabilidade de 4T1 em função da concentração dos extratos (a e b) SPE (Semente de *P. edulis*) e (c e d) SPS (Semente de *P. setacea*), após 48h de tratamento



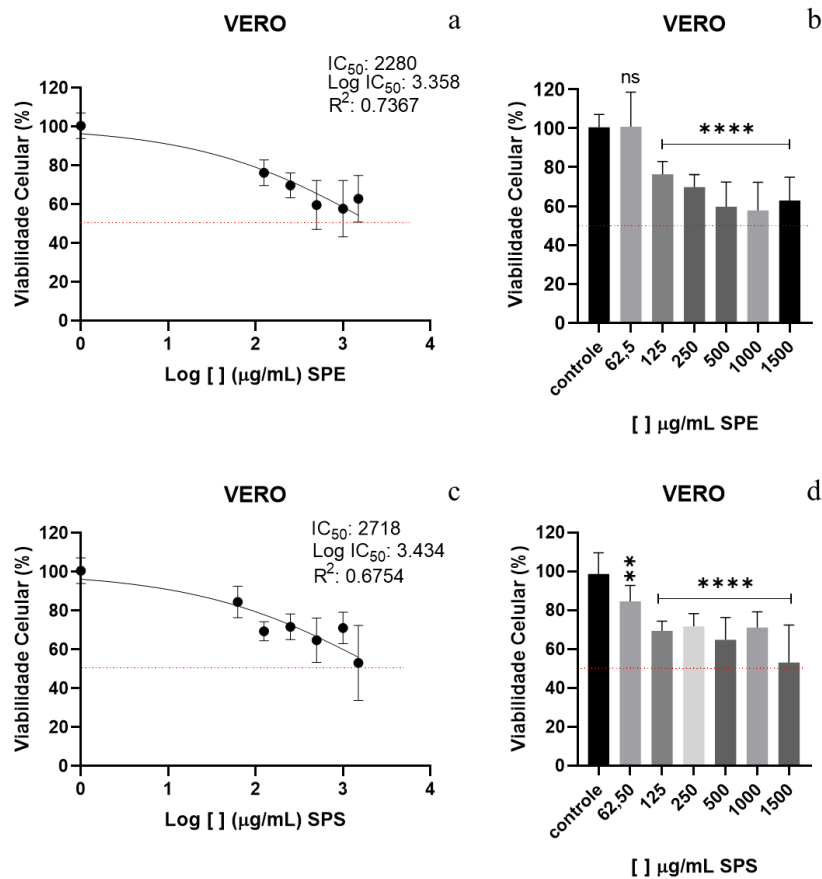
Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 7a e 7c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 7b e 7d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,9$ ), \* ( $P = 0,021$ ), \*\*\* ( $P = 0,0005$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ).  
Fonte: A autora.

Para a linhagem VERO (Figura 8) também houve adaptações nas concentrações ensaiadas com acréscimo da concentração  $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , visto que até  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  a viabilidade não foi tão afetada, como observado nas linhagens murinas. Mesmo com o aumento na concentração, o  $R^2$  obtido pela regressão não linear ficou abaixo do valor considerado

satisfatório que seria de 0,80 (SPE  $R^2$ : 0,73; SPS  $R^2$ : 0,67), porém a baixa toxicidade de SPE e SPS em VERO foi confirmada.

As maiores concentração de SPE (1500, 1000 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) reduziram a viabilidade da linhagem VERO em 37,39 %, 42,53 e 40,58 %, respectivamente, e o  $\text{IC}_{50}$  calculado foi de 2280  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figuras 8a e 8b). A concentração de 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de SPS reduziu 46,13 % da viabilidade celular, comparado ao controle. Por outro lado, nos tratamentos com SPS, as concentrações de 1000 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  reduziram 27,86 e 34,19 % da viabilidade, respectivamente, com isso o  $\text{IC}_{50}$  de SPS chegou a 2718  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figuras 8c e 8d).

Figura 8 - Viabilidade de VERO em função da concentração dos extratos (a e b) SPE (Semente de *P. edulis*) e (c e d) SPS (Semente de *P. setacea*), após 48h de tratamento

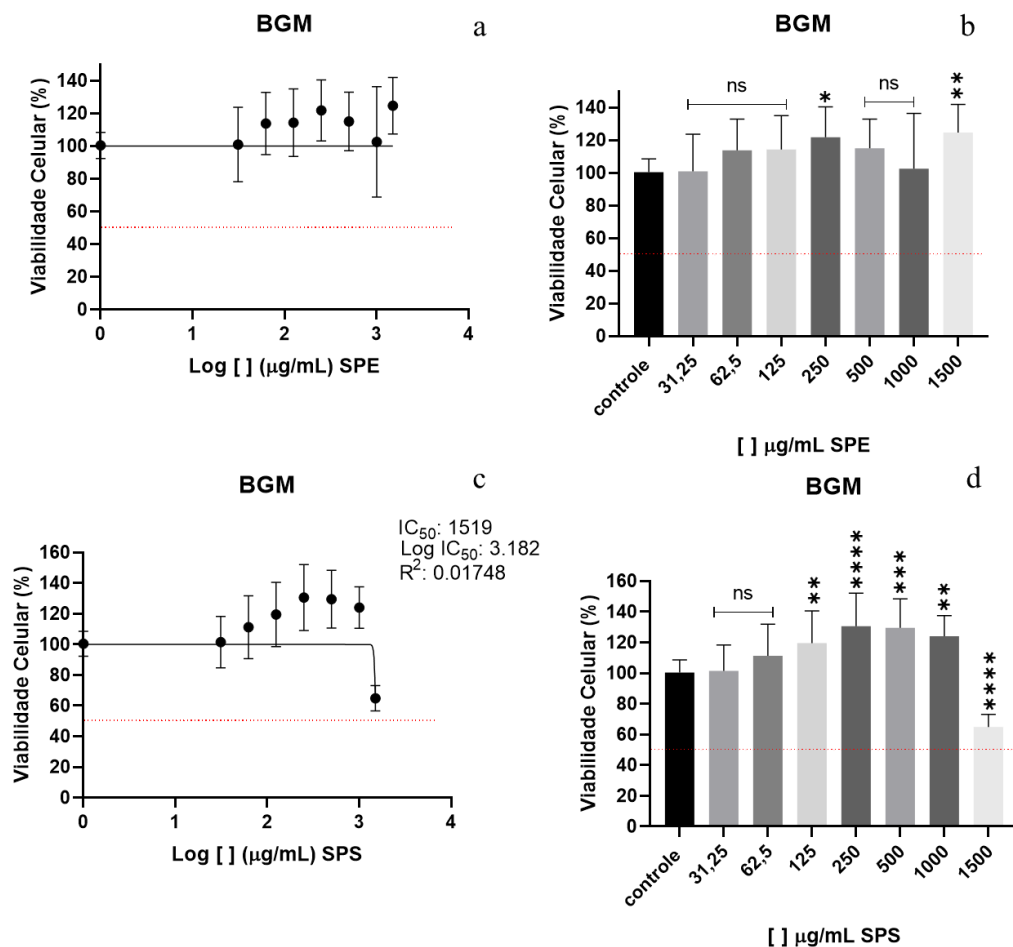


Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 8a e 8c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 8b e 8d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P > 0,9$ ), \*\* ( $P = 0,001$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

Como observado acima, os valores de  $\text{IC}_{50}$  na linhagem normal, VERO, foram muito altos (2280  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para SPE e 2718  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para SPS), indicando uma baixa toxicidade dos extratos. Visando confirmar essa observação, os extratos também foram testados em outra linhagem normal, a BGM, que possui origem equivalente a linhagem VERO (Figura 9). Para o

extrato SPE não foi possível plotar uma regressão não linear visto que todas as concentrações ensaiadas exibiram viabilidade igual ou superiores ao controle sem tratamento (Figuras 9a e 9b), segundo o teste de Dunnett. No extrato SPS apenas a maior concentração reduziu a viabilidade de forma significativa estatisticamente (Figuras 9c e 9d), porém essa redução foi menor do que 50 % (35,49%).

Figura 9 - Viabilidade de BGM em função da concentração dos extratos (a e b) SPE (Semente de *P. edulis*) e (c e d) SPS (Semente de *P. setacea*), após 48h de tratamento

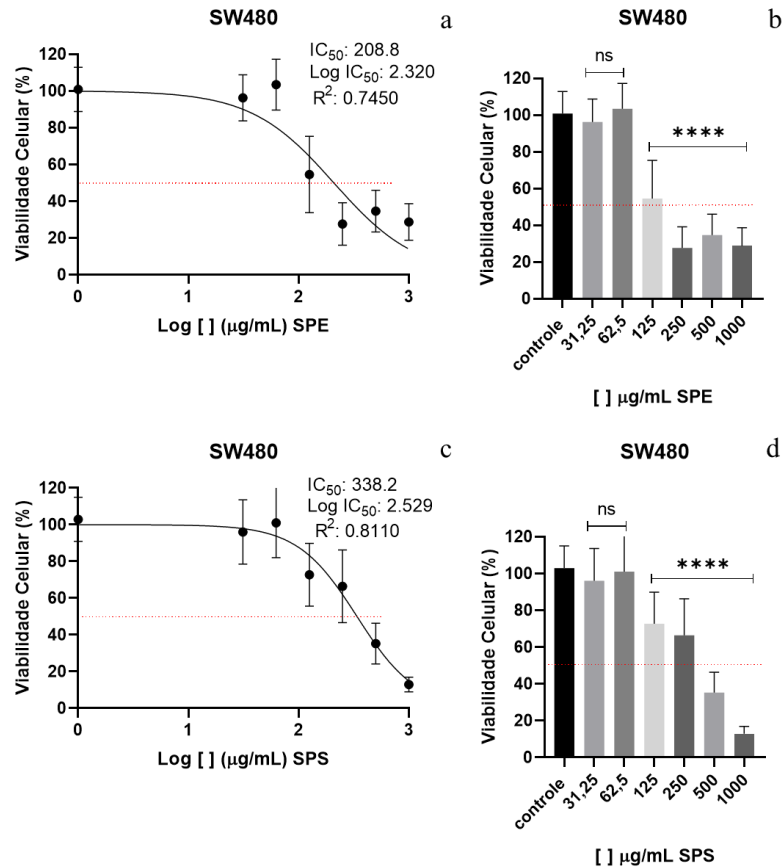


Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 9a e 9c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 9b e 9d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P > 0,9$ ), \* ( $P = 0,02$ ), \*\* ( $P = 0,006$ ), \*\*\* ( $P = 0,0001$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

A viabilidade das células SW480 sofreu redução de 45,91 % com SPE 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figuras 10a e 10b) e 65,58 % com 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , concentração 4 vezes maior. Maiores reduções foram observadas em 250 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  de SPE (72,60 % e 71,50 %), respectivamente, também com uma diferença de 4 vezes a concentração. Já no tratamento com SPS, as concentrações de 1000 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  mostraram reduções de 87,41 % e 65,79 % na viabilidade, respectivamente

(Figura 10c e 10d). Enquanto a concentração de  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  reduziu 35,48 % da viabilidade, comparado ao controle.

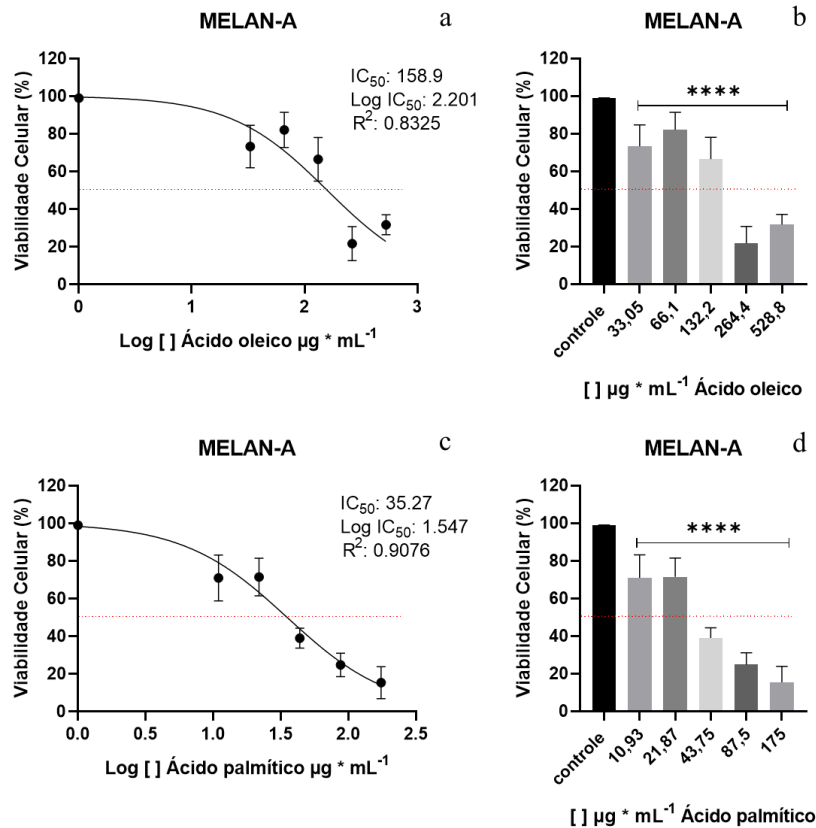
Figura 10: Viabilidade de SW480 em função da concentração dos extratos (a e b) SPE (Semente de *P. edulis*) e (c e d) SPS (Semente de *P. setacea*), após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 10a e 10c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 10b e 10d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P > 0,9$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

A concentração representativa da média de ácido oleico encontrado nos extratos SPE e SPS,  $264,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , foi responsável pela redução de 78,11 % na viabilidade da linhagem melan-a (Figuras 11a e 11b). Dobrando a concentração,  $528,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a redução foi menor, de 68,03 %, enquanto nas demais concentrações a média de viabilidade foi maior que 60 %. Com o ácido palmítico, a concentração equivalente a encontrada nos extratos SPE e SPS,  $87,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , não foi a mais tóxica, mas reduziu em 74,95 % a viabilidade de melan-a (Figuras 11c e 11d). O efeito citotóxico apresentou característica dose-resposta, sendo que as menores concentrações mostraram viabilidade acima de 70 %. Os valores de IC<sub>50</sub> calculados para melan-a foram:  $158,9 \mu\text{g mL}^{-1}$  no tratamento com o ácido oleico e  $35,27 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o ácido palmítico.

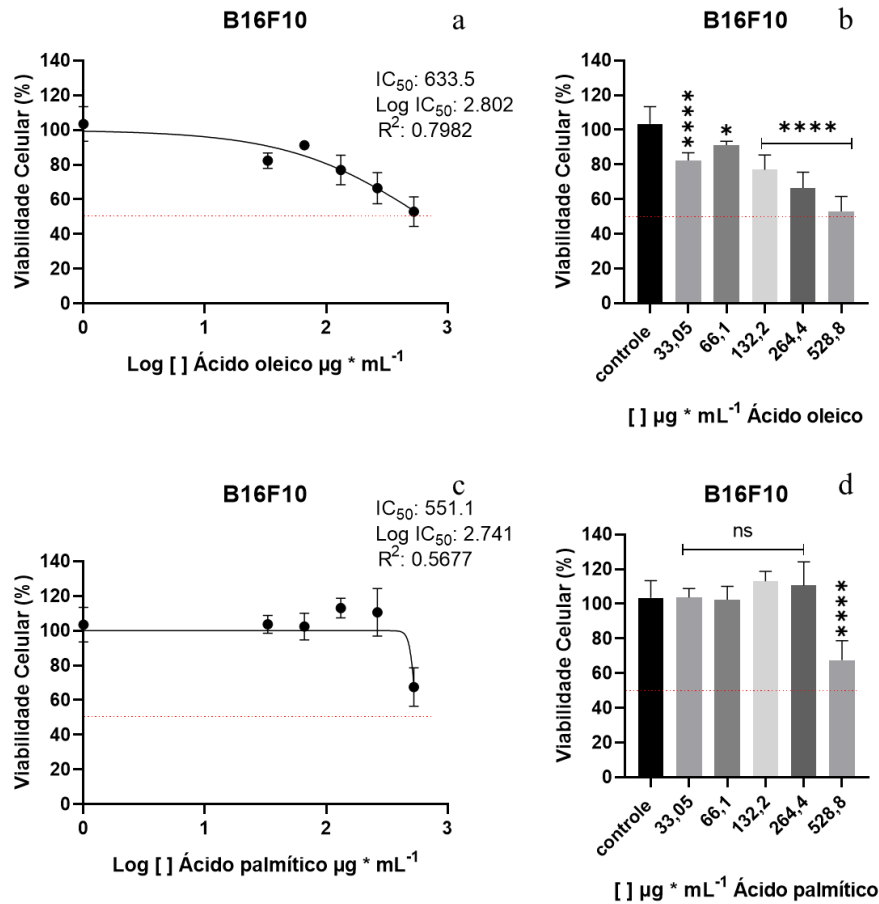
Figura 11 - Viabilidade de melan-a em função da concentração do ácido oleico (a e b) e do ácido palmítico (c e d), após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 11a e 11c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 11b e 11d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelo símbolo: \*\*\*\* (P < 0,0001). Fonte: A autora.

Diferente das baixas concentrações de IC<sub>50</sub> para melan-a (158,9  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  com o ácido oleico e 35,27  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  para o ácido palmítico), na linhagem de câncer melanoma murino (B16F10) as concentrações de IC<sub>50</sub> calculadas foram elevadas: 633,5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  para o ácido oleico e 551,1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  para o ácido palmítico (Figura 12). Com isso, os ácidos isolados não apresentaram seletividade, apesar do extrato SPS ter exibido seletividade de 2,64 para a linhagem B16F10.

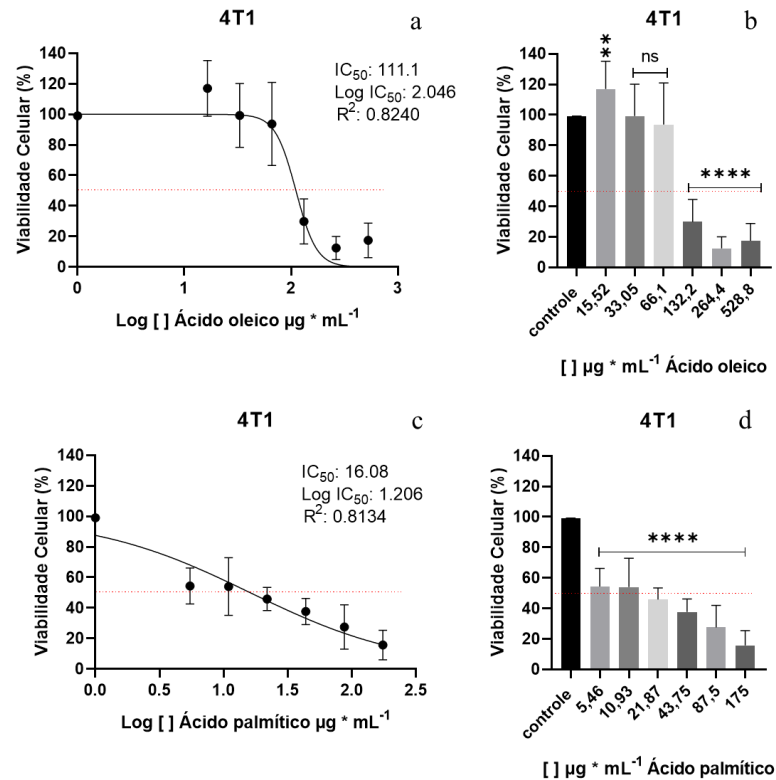
Figura 12 - Viabilidade de B16F10 em função da concentração do ácido oleico (a e b) e do ácido palmítico (c e d), após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 12a e 12c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 12b e 12d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P > 0,9$ ), \* ( $P = 0,02$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

Diferente dos extratos, os ácidos graxos isolados apresentaram boas citotoxicidades no câncer de mama murino (4T1) com as 3 maiores concentrações exibindo porcentagem de viabilidades abaixo de 50 % (Figura 13). Para o ácido oleico a concentração de maior efeito foi 264,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com 87,40 % de redução na viabilidade de 4T1 (Figuras 13a e 13b). Enquanto a concentração de 15,52  $\mu\text{g mL}^{-1}$  aumentou a viabilidade em 18,18 % e o IC<sub>50</sub> calculado foi de 111,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O efeito do ácido palmítico em 4T1 também foi dose-resposta, sendo que a concentração 87,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi responsável por 72,25 % de redução na viabilidade celular e seu dobro, 175  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por 84,07 % (Figuras 13c e 13d). O IC<sub>50</sub> calculado para o ácido palmítico em 4T1 foi 16,08  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

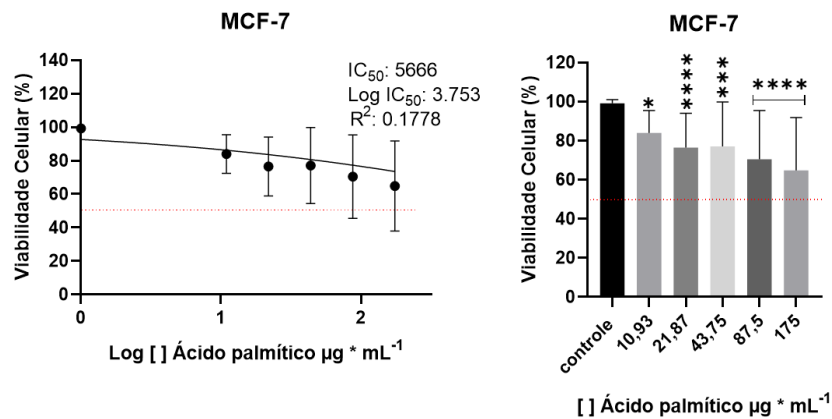
Figura 13 - Viabilidade de 4T1 em função da concentração do ácido oleico (a e b) e do ácido palmítico (c e d), após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 13a e 13c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 13b e 13d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P > 0,9$ ), \*\* ( $P = 0,009$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

Como o IC<sub>50</sub> calculado para o ácido palmítico em 4T1 foi 16,08  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e para a linhagem normal (melan-a) foi de 35,27  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , a seletividade do ácido para o câncer de mama murino (4T1) ficou em 2,19. Buscando avaliar se a seletividade se mantinha no câncer de mama humano (MCF-7), o ácido palmítico também foi testado nessa linhagem (Figura 14). Todas as concentrações testadas reduziram a viabilidade celular, comparado ao controle, segundo o teste de Dunnett. Porém, as reduções não chegaram a 50 % em nenhuma concentração, a maior (175  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) apresentou inibição de 34,66 %. Esse comportamento se refletiu no IC<sub>50</sub>, que foi estimado muito acima das concentrações testadas (5666  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e no R<sup>2</sup> da regressão não linear que foi muito baixo (0,17).

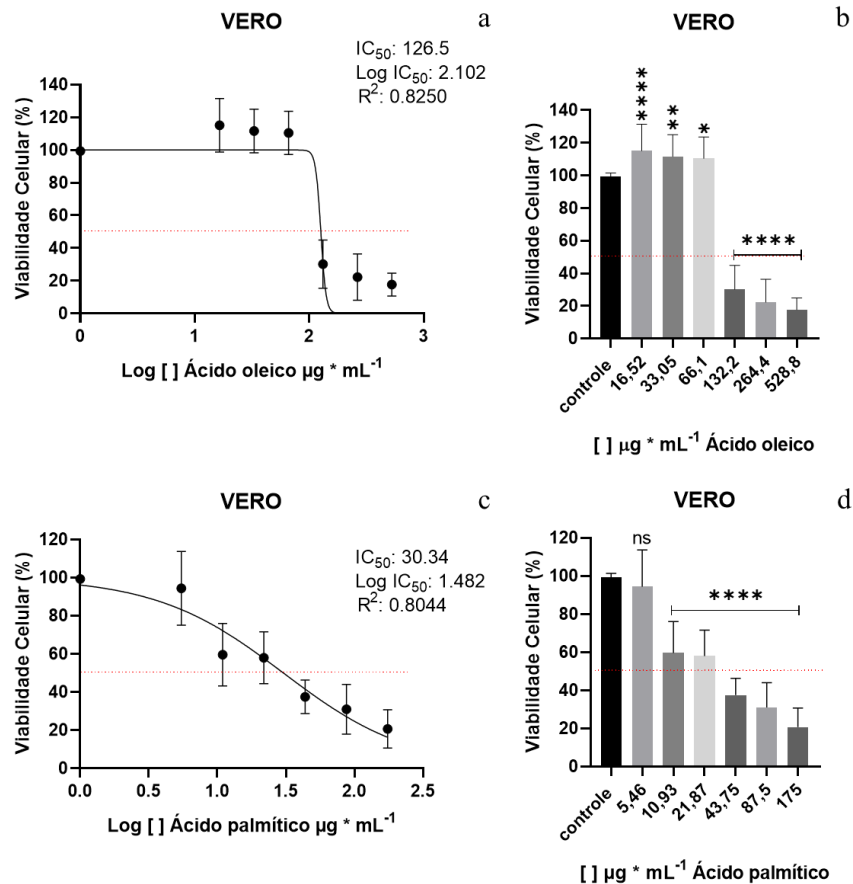
Figura 14 - Viabilidade de MCF-7 em função da concentração do ácido palmítico (a e b), após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figura 14a: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figura 14b: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: \* (P = 0,01), \*\*\* (P = 0,0002) e \*\*\*\* (P < 0,0001). Fonte: A autora.

Diferente dos extratos SPE e SPS onde a viabilidade das células VERO foi relativamente pouco afetada, os ácidos graxos exibiram efeito de inibição dose-resposta (Figura 15). As maiores concentrações de ácido oleico (528,8; 264,4 e 132,2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) tiveram reduções de 82,16; 77,66 e 69,68 %, respectivamente (Figuras 15a e 15b). Enquanto as menores concentrações exibiram médias de viabilidade celular superiores ao controle. O IC<sub>50</sub> calculado para o ácido oleico foi de 126,5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . As concentrações de ácido palmítico entre 175 e 10,93  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  foram responsáveis por reduções na viabilidade da linhagem VERO, de forma dose-dependente, com viabilidade de 20,78% em 175  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , ou seja, com 79,21% de redução, em relação ao controle (Figuras 15c e 15d). A concentração de 10,93  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de ácido palmítico exibiu 60,02% de redução na viabilidade e o IC<sub>50</sub> foi de 30,34  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

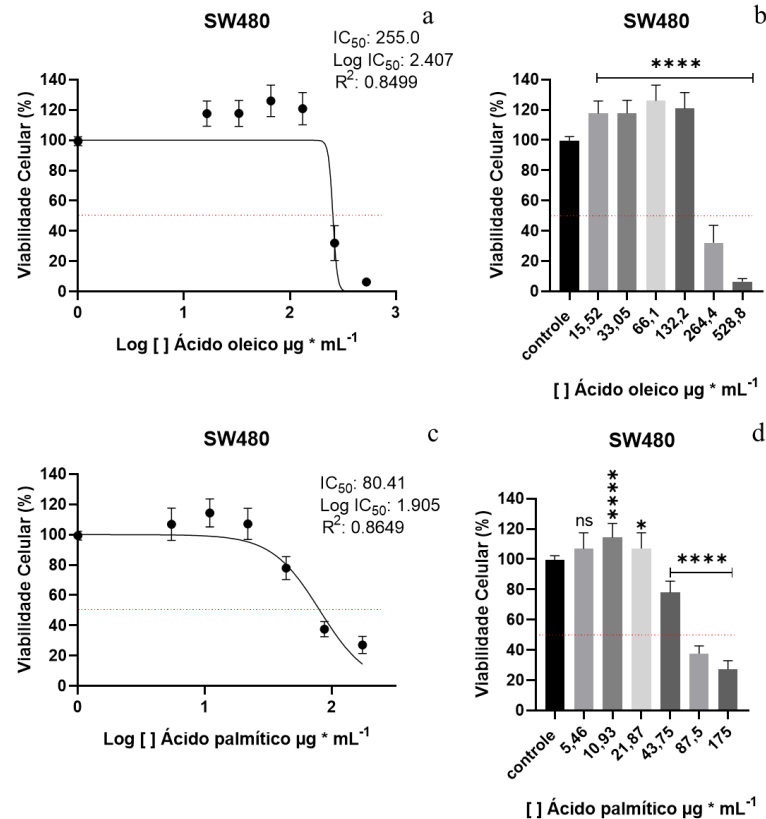
Figura 15 - Viabilidade de VERO em função da concentração do ácido oleico (a e b) e do ácido palmítico (c e d), após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 15a e 15c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 15b e 15d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P > 0,48$ ), \* ( $P = 0,01$ ), \*\* ( $P = 0,0014$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

A viabilidade das células de câncer colorretal humano (SW480) sofreu redução principalmente nas maiores concentrações dos ácidos graxos (Figura 16). Com o ácido oleico a 528,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a redução chegou a 93,64 % e em 264,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 67,73% (Figuras 16a e 16b). As menores concentrações testadas (132,2 a 15,52  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) não mostraram efeitos citotóxicos, comparado ao controle, e o IC<sub>50</sub> ficou em 255  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As concentrações de ácido palmítico variando de 175 a 43,75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram responsáveis por reduções na viabilidade de SW480 entre 72,66 % e 21,66 % (Figuras 16c e 16d). Concentrações entre 21,87 e 5,46  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não exibiram redução na viabilidade celular, o IC<sub>50</sub> calculado para o ácido palmítico foi de 80,41  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Figura 16 - Viabilidade de SW480 em função da concentração do ácido oleico (a e b) e do ácido palmítico (c e d), após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 16a e 16c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 16b e 16d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P > 0,06$ ), \* ( $P = 0,03$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

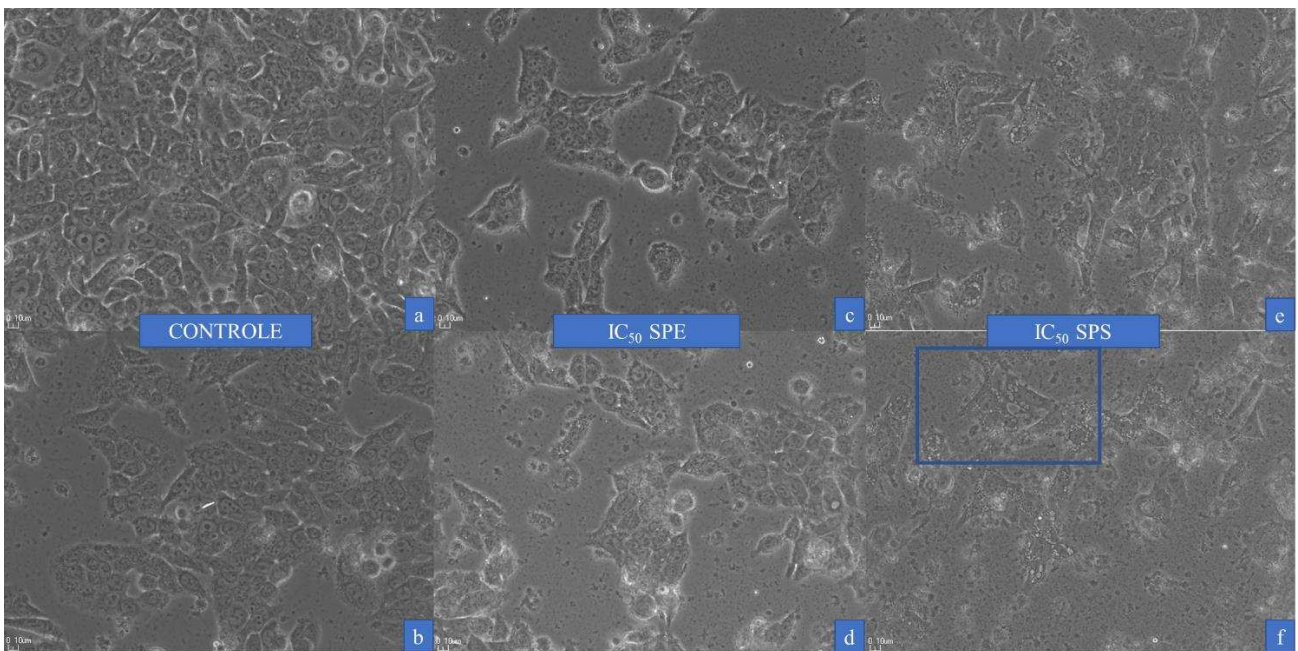
Como indicado no texto acima, na Tabela 4, os valores de  $IC_{50}$  para os extratos e para os ácidos graxos, identificados nos extratos, foram calculados a partir da viabilidade celular. A partir dos dados de HillSlope do  $IC_{50}$  foram calculados os valores de  $IC_{10}$  e  $IC_{90}$  dos tratamentos que estão apresentados na Tabela 1 no apêndice A. Todos esses foram considerados para o cálculo dos Índices de seletividades.

As seletividades calculadas (VERO/SW480) utilizando os valores de  $IC_{90}$ , mantiveram os padrões de seletividade encontrados anteriormente nos extratos, com SPE e SPS mostrando uma melhor seletividade para SW480, comparado as demais linhagens (Tabela 1 no apêndice A). Curiosamente, os valores de  $IC_{90}$  estimados foram próximos em SPE e SPS na linhagem SW480, sendo 1393 e 1323  $\mu g mL^{-1}$ , respectivamente. Diferente da seletividade encontrada nos ácidos graxos com o  $IC_{50}$ , utilizando o  $IC_{90}$  quem exibiu seletividade contra a linhagem 4T1 foi o ácido oleico. Infelizmente os valores de  $IC_{90}$  são muito altos para possíveis testes em organismos multicelulares.

### 3.4 Avaliação da morfologia celular por aquisição de imagens após o tratamento com o IC<sub>50</sub> dos extratos SPE e SPS e do ácido palmítico

Para melhor ilustrar as observações morfológicas, foram selecionados aleatoriamente dois campos distintos de células tratadas. Na figura 17 é possível comparar o efeito visual na morfologia das células da linhagem SW480 que não receberam tratamento com os extratos, apenas com o DMSO (0,5 %), com as células que foram tratadas com o IC<sub>50</sub> do extrato de sementes de *Passiflora edulis* (SPE) e com o IC<sub>50</sub> do extrato de sementes de *Passiflora setacea* (SPS). Enquanto no controle as células se mantêm aderidas e em maior número, nos tratamentos observamos um menor número de células aderidas e um maior número de células vacuolizadas, especialmente após o tratamento com o extrato SPS (Figuras 17e e 17f).

Figura 17 – Células da linhagem SW480 tratadas com extratos de diferentes espécies de *Passiflora* no aumento de 20x



Figuras 17a e 17b: células do controle, tratadas com 0,5% de DMSO; Figuras 17c e 17d: células tratadas com o IC<sub>50</sub> do extrato de sementes de *Passiflora edulis* (SPE); Figuras 17e e 17f: células tratadas com o IC<sub>50</sub> do extrato de sementes de *Passiflora setacea* (SPS). Estão representadas duas imagens obtidas de campos diferentes para cada tratamento. Fonte: A autora.

O acréscimo de vacúolos nas células tratadas com o extrato SPS pode ser melhor observado na Figura 18, onde a região demarcada na Figura 17f aparece nos aumentos de 40x (Figura 18a) e 80x (Figura 18b).

Figura 18 – Células da linhagem SW480 tratadas com o IC<sub>50</sub> do extrato das sementes de *Passiflora setacea* (SPS)

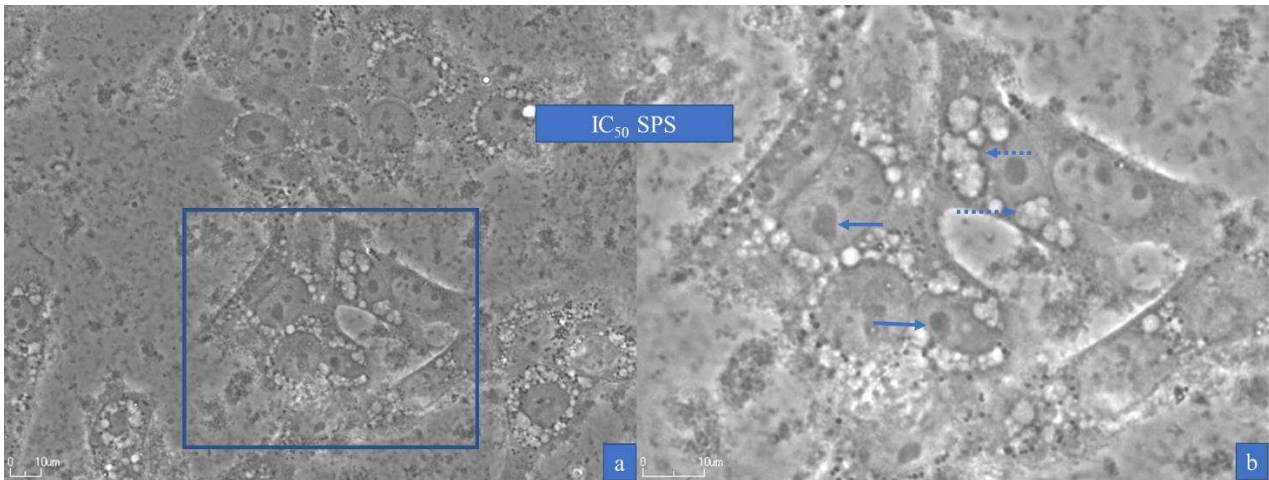
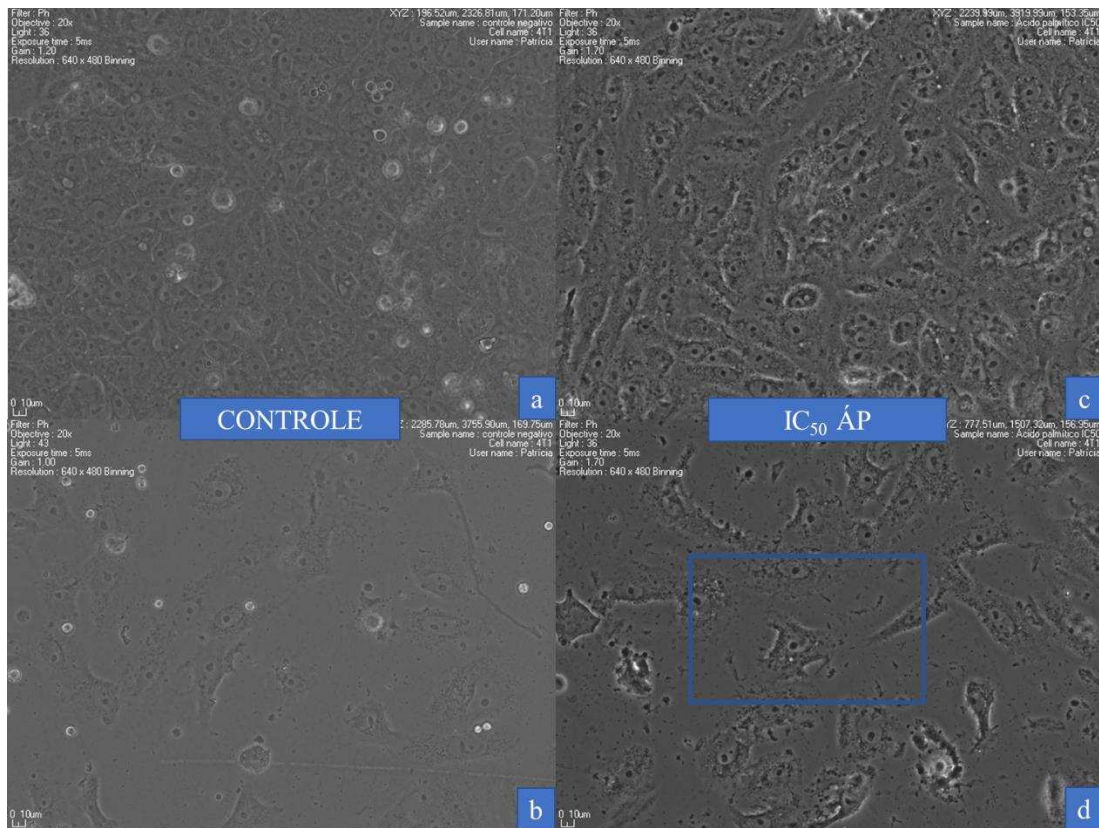


Figura 18a mostra um aumento de 40x e Figura 18b mostra um aumento de 80x da área demarcada na Figura 18a. As setas sólidas indicam condensação perinuclear da cromatina e setas com ponto redondo indicam vacúolos. Fonte: A autora.

Na linhagem 4T1 as diferenças morfológicas mais perceptíveis das células tratadas com o ácido palmítico foram um aumento no número de vacúolos no interior das células e de debris (vestígios de células mortas ou danificadas), comparado ao observado no controle (Figura 19d). Na figura 20 é possível observar a presença de debris na área demarcada em 19d nos aumentos de 40x (Figura 20a) e 80x (Figura 20b).

Figura 19 – Células da linhagem 4T1 tratadas com o IC<sub>50</sub> do ácido palmítico (ÁP) no aumento de 20x



Figuras 19a e 19b: células do controle, tratadas com 0,5% de DMSO; Figuras 19c e 19d: células tratadas com a concentração de IC<sub>50</sub> do ÁP. Estão representadas duas imagens obtidas de campos diferentes para cada tratamento. Fonte: A autora.

Figura 20 – Células da linhagem 4T1 tratadas com o IC<sub>50</sub> do ácido palmítico (ÁP)

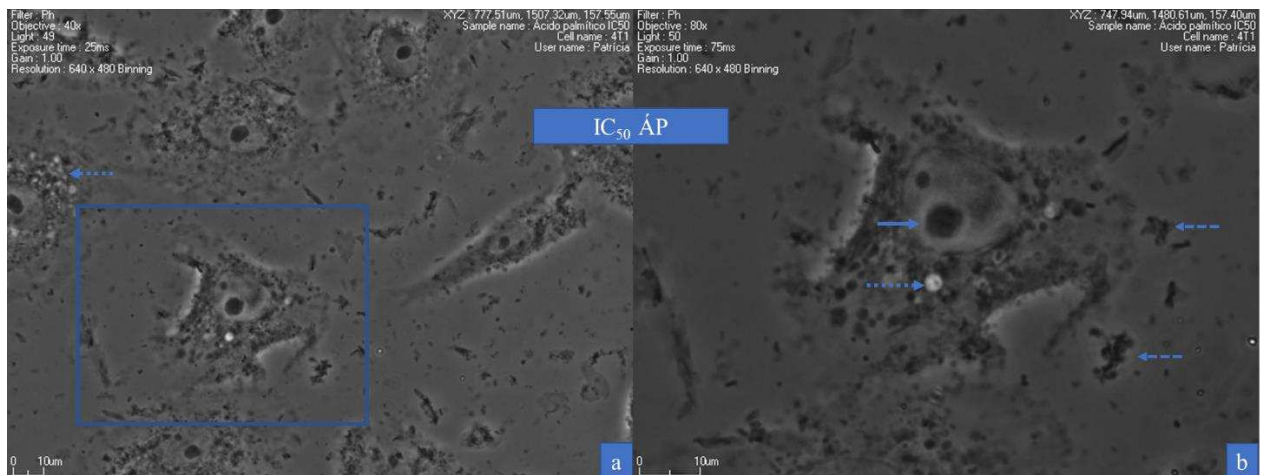


Figura 20a mostra um aumento de 40x e Figura 20b mostra um aumento de 80x da área delimitada na Figura 20a. A seta sólida indica núcleo condensado, setas com pontos redondos indicam vacúolos e setas com pontos quadrados indicam a presença de debris. Fonte: A autora.

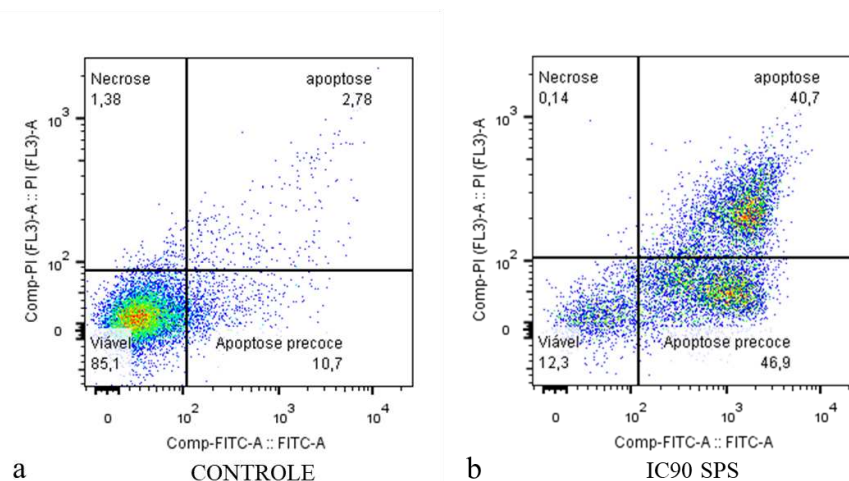
### 3.5 Avaliação do tipo de morte celular e do ciclo celular por Citometria de Fluxo

Os extratos de *Passiflora* e ácidos graxos selecionados para determinação do tipo de morte celular foram: O extrato SPS na linhagem B16F10 (IS = 2,63) e SW480 (IS = 8,03), o extrato SPE na linhagem SW480 (IS = 10,9) e o ácido palmítico na linhagem 4T1 (IS = 2,19). As células foram tratadas com os valores de IC<sub>90</sub> correspondente a cada tratamento, sendo eles: IC<sub>90</sub> SPS: 2245,53 µg mL<sup>-1</sup> em B16F10; IC<sub>90</sub> SPS: 1323,41 µg mL<sup>-1</sup> em SW480; IC<sub>90</sub> SPE: 1393,29 µg mL<sup>-1</sup> em SW480; IC<sub>90</sub> do Ácido palmítico: 369,69 µg mL<sup>-1</sup> em 4T1.

Para avaliar o tipo da morte celular desencadeado, foram utilizados o kit de proteína Anexina V conjugada ao fluoróforo FITC (ImunoTools®, Friesoythe, NI, Alemanha) e o iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) com posterior análise no Citômetro de fluxo BD FACS Verse®. Resumidamente, a Anexina V, em presença de cálcio, tem a capacidade de ligar-se a fosfatidilserina que é translocada para a superfície externa da membrana quando as células entram em apoptose precoce. O iodeto de propídeo tem a capacidade de intercalar-se nos pares de base do DNA, porém é impermeável a membrana plasmática íntegra.

Nas células de melanoma murino (B16F10), o extrato SPS na concentração de 2245,53 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 21) reduziu a porcentagem de células viáveis de 85,1 %, observado no controle, para 12,3 %, após 24 horas de tratamento.

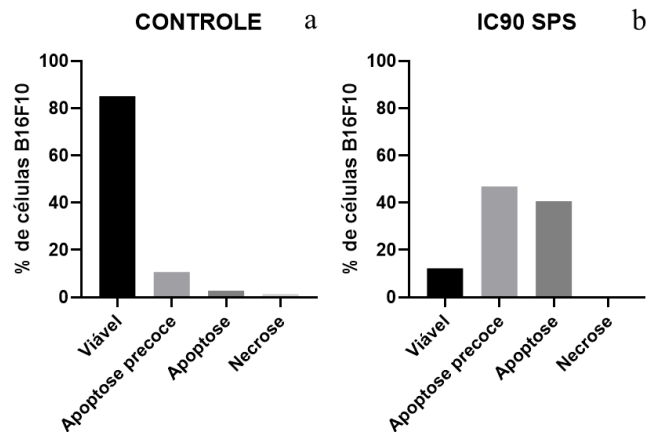
Figura 21 – Determinação do tipo de morte celular induzida na linhagem B16F10 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com a concentração de IC<sub>90</sub> do extrato de *Passiflora setacea* (SPS). Necrose (Q1): células positivas para o iodeto de propídeo; Apoptose (Q2) marcação dupla com iodeto e anexina V; Viável (Q3): células sem marcador; Apoptose precoce (Q4): positivas apenas para a Anexina V. Fonte: A autora.

O tipo de morte celular observado foi a apoptose, em 87,6 % de células, comparado a 11,48 % nas células sem tratamento (Figura 22). 46,9 % das células estavam em apoptose precoce e 40,7 % em apoptose.

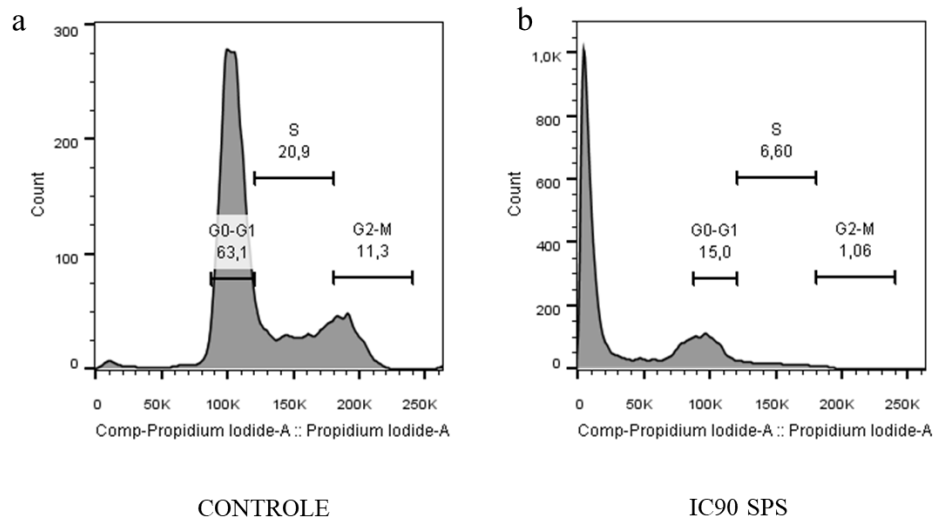
Figura 22 - Determinação do tipo de morte celular induzida na linhagem B16F10 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com a concentração de IC<sub>90</sub> do extrato de *Passiflora setacea* (SPS). Fonte: A autora.

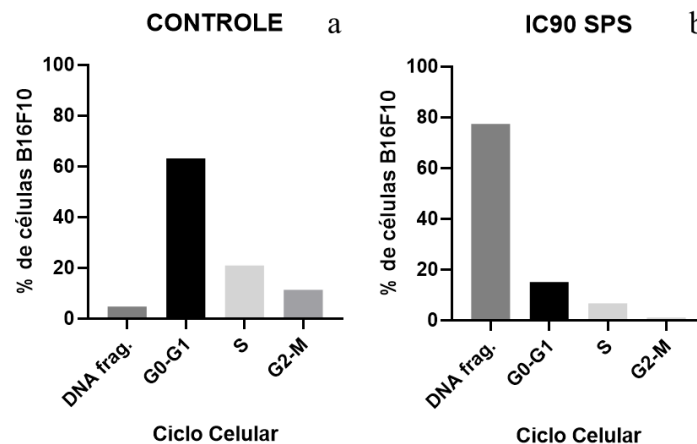
Para avaliação do ciclo celular, as células foram fixadas com álcool etílico e coradas com uma solução contendo iodeto de propídeo antes da análise no Citômetro de fluxo. Baseado nos dados de ciclo celular das células do controle e visando manter a proporção entre as fases do ciclo equivalentes após os tratamentos, nós calculamos os valores esperados para cada fase. Visto que 15 % das células tratadas com o IC<sub>90</sub> de SPS estavam em G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>; 4,9 % das células deveriam estar na fase S e 2,68 % em G<sub>2</sub>-M, com 1,11 % de DNA fragmentado. Como observamos nas Figuras 23 e 24, o tratamento com SPS manteve próximo as porcentagens esperadas na linhagem B16F10 (6,60 % na fase S e 1,06 % em G<sub>2</sub>-M) porém a quantidade de DNA fragmentado foi de 77,34 %, um aumento de 76,23 %.

Figura 23 – Análise do Ciclo Celular na linhagem B16F10 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do extrato de *Passiflora setacea* (SPS). G0-G1, S e G2-M observados nos tratamentos. A análise é baseada na quantificação na quantidade de DNA no interior das células. Assim, células na fase G2-M do ciclo têm o dobro de DNA do que as células na fase G0-G1, representadas pela intensidade de fluorescência. Fonte: A autora.

Figura 24 – Análise do Ciclo Celular na linhagem B16F10 por Citometria de Fluxo

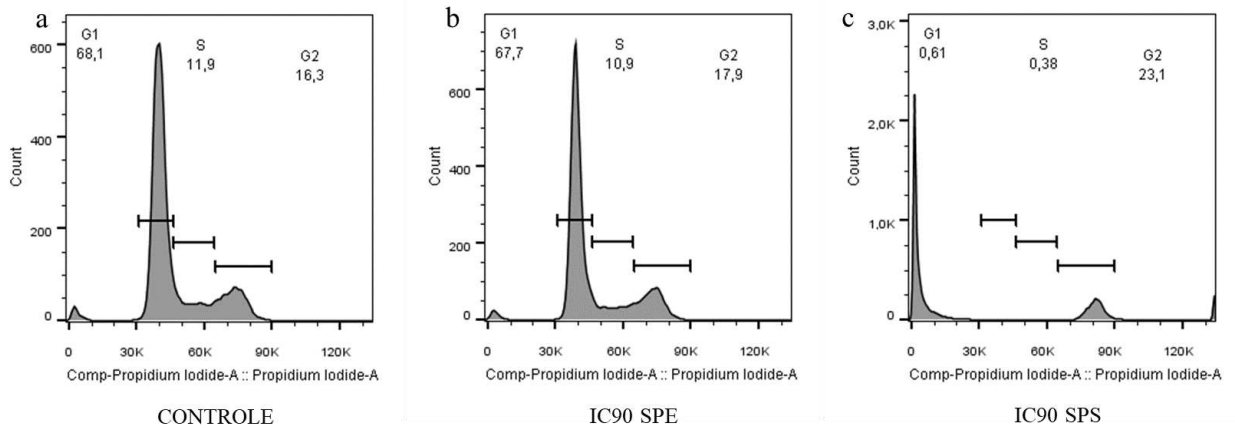


(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do extrato de *Passiflora setacea* (SPS). G0-G1, S e G2-M observados nos tratamentos. Fonte: A autora.

Baseado no ciclo celular das células SW480 sem tratamento (controle), para manter a proporção entre as fases equivalentes, visto que 67,7 % das células tratadas com o IC<sub>90</sub> de SPE estavam em G0-G1; 11,83 % deveriam estar na fase S e 16,2 % em G2-M, com 3,6 % de DNA fragmentado. Como podemos ver na Figuras 25b e 26b, tais proporções foram mantidas com pequenas variações: 10,9 % das células na fase S e 17,9 % em G2-M, com 3,5 % de DNA fragmentado. Já o tratamento com o IC<sub>90</sub> de SPS alterou visivelmente o ciclo celular das células SW480, comparado as células do controle (Figuras 25c e 26c). Segundo os valores obtidos para cada fase, as células tiveram uma tendência em se acumular na fase G2-M, além de ter uma

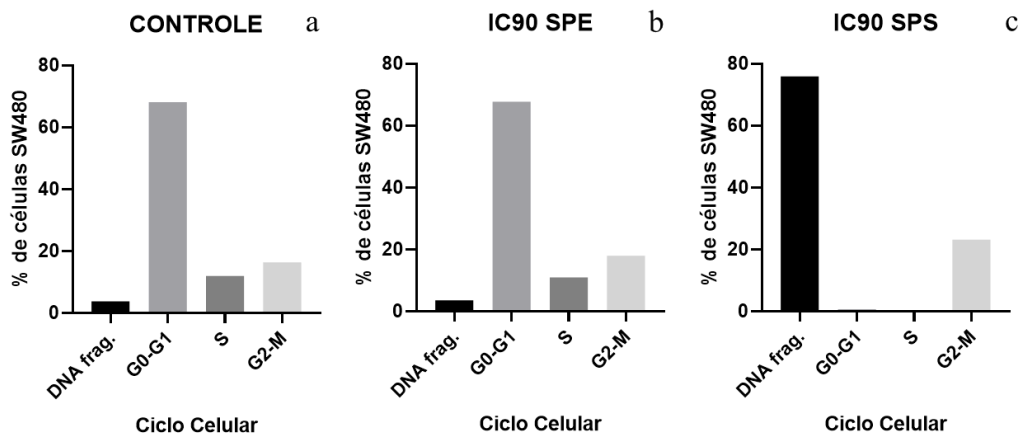
taxa elevada de DNA fragmentado. Para manter a proporção entre as fases equivalentes, com 0,61 % das células em G0-G1; 0,10 % deveriam estar na fase S e 0,14 % em G2-M, com 0,03 % de DNA fragmentado. Porém foram observados 0,38 % na fase S e 23,1 % em G2-M, com 75,91 % de DNA fragmentado.

Figura 25 – Análise do Ciclo Celular na linhagem SW480 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do extrato de *Passiflora edulis* (SPE); (c) e com o IC90 do extrato de *Passiflora setacea* (SPS). G1 (G0-G1), S e G2 (G2-M) observados nos tratamentos. A análise é baseada na quantificação na quantidade de DNA no interior das células. Assim, células na fase G2-M do ciclo têm o dobro de DNA do que as células na fase G0-G1, representadas pela intensidade de fluorescência. Fonte: A autora.

Figura 26 – Análise do Ciclo Celular na linhagem SW480 por Citometria de Fluxo

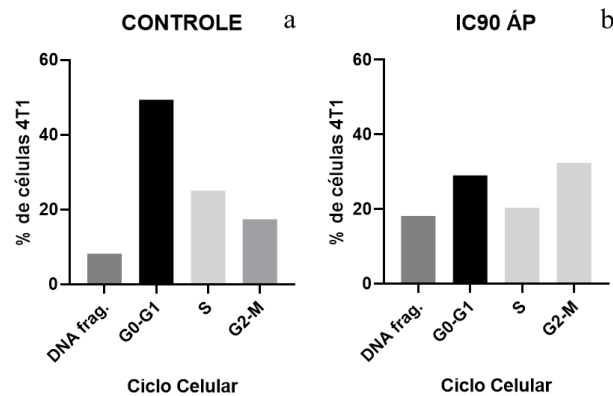


(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do extrato de *Passiflora edulis* (SPE); (c) e com o IC90 do extrato de *Passiflora setacea* (SPS). G0-G1, S e G2-M observados nos tratamentos. Fonte: A autora.

As células de câncer de mama murino (4T1) tratadas com o IC<sub>90</sub> do ácido palmítico (ÁP) tiveram alterações no ciclo celular, comparadas as células do controle (Figura 27). Baseado no ciclo celular das células do controle, como foram observadas 29 % das células na fase G0-G1, deveriam estar na fase S 14,6 % das células e 11,58 % em G2-M, com 4,81 % de

DNA fragmentado. Porém foram observados um total de 20,4 % na fase S; 32,4 % na fase G2-M e 18,2 % de DNA fragmentado. Todos esses parâmetros foram maiores do que o esperado.

Figura 27 – Análise do Ciclo Celular na linhagem 4T1 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do ácido palmítico. G0-G1, S e G2-M observados nos tratamentos. Fonte: A autora.

#### 4 DISCUSSÃO

Conforme disponibilidade de material vegetal, foram obtidos 3 extratos de *P. setacea* e 2 extratos de *P. edulis*. O rendimento dos extratos foi calculado seguindo peso do extrato bruto seco (g) em função do peso do material em pó (g). Os rendimentos das cascas foram abaixo de 1% (CPS = 0,99 % e CPE = 0,96 %) e da folha de *P. setacea* (FPS) foi de 2,63 %. As sementes exibiram melhores rendimentos com SPE = 26,75 % e SPS = 35,64 %. Provavelmente favorecidas pela escolha do solvente. O acetato de etila é um éster formado entre o ácido acético e o etanol, em presença de ácido sulfúrico, com papel de solvente polar aprótico (PubChem 2021). Isso facilita a extração tanto de compostos polares como de compostos apolares, como os ácidos linoléico, oléico, palmítico e esteárico, já identificados no óleo de sementes de maracujá (Barrales *et al.* 2015).

As espécies *P. incarnata*, *P. edulis* e *P. alata*, principalmente, são popularmente conhecidas no Brasil como produtoras do fruto “maracujá”, muito apreciado na elaboração de sucos e geleias pela indústria agroalimentar (Dhawan *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2009) gerando uma quantidade expressiva de resíduos. São práticas comuns na destinação desses subprodutos o espalhamento, aterro, incineração, alimentação animal, digestão anaeróbia e compostagem, porém essas abordagens, além de gerarem poluição, agregam pouco valor a matérias primas que poderiam ser exploradas na busca de compostos bioativos (Garcia-Garcia *et al.*, 2019).

Cascas, sementes, folhas e flores de maracujá são boas fontes de compostos naturais, com satisfatória concentração de fibras alimentares, e significativa atividade antioxidante (Martínez *et al.* 2012).

Da Silva e colaboradores (2020) compararam o rendimento do extrato hidroalcolico de folhas de *Passiflora mucronata* nas técnicas de extração líquido-líquido, fluido supercrítico e encontraram resultados superiores com Soxhlet (6,03 %: hexano; 2,51 %: diclorometano). As porcentagens de rendimento (%) também foram calculadas em relação à massa de folha seca e foram compatíveis com o rendimento encontrado, por nós, para a folha de *P. setacea* (2,63 % com acetato de etila) na extração líquido-líquido.

A triagem ou do inglês “screening” como método na farmacologia já foi empregado para diferentes espécies de *Passiflora*. Quando testado na concentração única de 100 µg mL<sup>-1</sup>, o extrato aquoso da parte aérea de *Passiflora acuminata* apresentou atividade contra a linhagem celular PC3 (câncer de próstata) com a ativação da caspase efetora tipo 3 (Suffredini *et al.* 2006). Um total de 14 espécies de *Passiflora* foram testadas à 50 µg mL<sup>-1</sup> contra o carcinoma de colón (HCT-116), glioblastoma (SF-295) e adenocarcinoma de ovário (OVACAR-8). *Passiflora capsularis* apresentou efeitos citotóxicos contra HCT-116 com 89,99 % de inibição da viabilidade e contra SF-295 com 52,20 % de inibição, após 72h, e o extrato de *Passiflora alata* inibiu mais de 96,03 % da viabilidade de todas as linhagens (Amaral *et al.* 2019).

É comum os estudos avaliarem apenas células cancerosas ou iniciar a triagem, em geral, por elas. Visando trabalhar com os extratos que pudessem ter uma melhor seletividade a células tumorais escolhemos realizar a triagem com a linhagem normal murina melan-a. Através da viabilidade nele encontrada, selecionamos os extratos SPE e SPS, por não exibirem efeitos tóxicos à concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup>, e comparamos seus efeitos na viabilidade das células cancerígenas vs normais.

O efeito dos extratos SPE e SPS na viabilidade das células melan-a foi similar, como indicam seus valores de IC<sub>50</sub> (448,7 µg mL<sup>-1</sup> - SPS e 418,3 µg mL<sup>-1</sup> em SPE). As viabilidades foram determinadas pela técnica de microcultura de tetrazólio (MTT) e suas reduções foram consideradas como efeito citotóxico (morte celular).

O extrato SPS foi mais eficiente que SPE contra a linhagem de melanoma murino com menor IC<sub>50</sub>: SPS: 170 µg mL<sup>-1</sup> e SPE: 482,1 µg mL<sup>-1</sup>. O menor IC<sub>50</sub> de SPS para B16F10 associado a um ligeiramente maior IC<sub>50</sub> para a linhagem normal melan-a, conferiram ao extrato SPS um maior IS, comparado a SPE (IS: 2,64 e 0,86, respectivamente). Na literatura a atividade

antitumoral de *P. setacea* já foi relatada onde esta exibiu citotoxicidade satisfatória contra células SF-295 (glioblastoma humano), à  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato das folhas, inibindo 29 % do crescimento celular. Entretanto, contra as células OVACAR-8 (carcinoma de ovário humano) e HT-116 (câncer de colón humano), foram observados acréscimos na viabilidade de aproximadamente 3 % (Amaral *et al.* 2019).

Trabalhos demonstraram que o extrato hidroalcolico das folhas de *P. mucronata* também se mostrou ativo contra a linhagem murina B16F10, com  $\text{IC}_{50}$  igual a  $17 \mu\text{g mL}^{-1}$  e contra a linhagem de câncer de próstata (PC3), com  $\text{IC}_{50}$  igual a  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  (da Silva *et al.* 2018). Apesar do potencial anticancerígeno, não foram realizados testes em células normais, inviabilizando o cálculo da seletividade. Do extrato foram identificados e isolados  $\beta$ -amirina, ácido oleanólico,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. Curiosamente o ácido oleanólico foi o único que apresentou efeitos citotóxicos para B16F10 superiores aos observados para o extrato bruto ( $\text{IC}_{50}$ :  $5,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (da Silva *et al.* 2018). Indicando que a presença de ácidos graxos em extratos de *Passiflora* pode contribuir para sua atividade citotóxica.

Em outro estudo, o extrato hidroalcolico das folhas de *P. mucronata* exibiu seletividade de 3,63 contra células cancerígenas K562 (da Silva *et al.* 2020), semelhante ao observado para SPS (IS: 2,64) para B16F10. A partir da fração hexânica do extrato de *P. mucronata* foram isolados os compostos  $\beta$ -amirina,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol que apresentaram melhores seletividades contra K562 com valores de 10,9; 12,3 e 12,5; respectivamente. O que não foi observado por nós ao testar os ácidos graxos de forma isolada. O ácido oléico e o ácido palmítico exibiram seletividades menores e iguais a 0,25 para B16F10 e o ácido palmítico exibiu seletividade de 2,19 para as células 4T1, porém nenhum dos extratos exibiu seletividade contra essa linhagem de câncer de mama.

Comparando os efeitos de ambos os extratos nas linhagens de primata VERO (normal) e humana SW480 (câncer colorretal), observamos os melhores índices de seletividade calculados. Um alto  $\text{IC}_{50}$  em VERO associado a um menor  $\text{IC}_{50}$  em SW480 conferiram as seletividades de 8,03 para SPS e 10,91 para SPE. Na literatura valores de seletividade maiores ou igual a 2,0 (Suffness e Pezzuto, 1990) e valores maiores que três são considerados interessantes (Bézivin *et al.* 2003). Assim como observamos para SPS no melanoma (IS = 2,64), ambos os extratos apresentaram seletividades promissoras para o câncer colorretal.

No entanto, utilizando o critério de extrato antiproliferativo de  $\text{IC}_{50} \leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$  para células cancerosas do National Cancer Institute (NCI – EUA) (Suffness e Pezzuto, 1990) os

extratos aqui avaliados apresentam baixa atividade. Porém, valores elevados de IC<sub>50</sub> parecem comuns à extratos de *Passiflora*. O extrato etanólico de folhas de *P. edulis* coletadas na Armênia exibiu IC<sub>50</sub> de 524 µg mL<sup>-1</sup> contra células SW480 e nos extratos aquoso das folhas e do suco o IC<sub>50</sub> ficou em 444 µg mL<sup>-1</sup>. Em células SW620 derivadas metastáticas, os valores de IC<sub>50</sub> para extratos etanólicos, aquosos e suco foram de 442 µg mL<sup>-1</sup>, 340 µg mL<sup>-1</sup> e 415 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Osma *et al.* 2005). Levando em consideração apenas os dados para SW480, os valores foram superiores aos observados neste trabalho para SPE IC<sub>50</sub>: 208,8 µg mL<sup>-1</sup> e SPS: 338,2 µg mL<sup>-1</sup>.

Valores de IC<sub>50</sub> abaixo do que observamos também foram registrados para o extrato etanólico de *Passiflora ligularis* sobre Hep3B (30 µg mL<sup>-1</sup>), HEPG-2, PLC/PRF/5 e SNU-182 (> 50 µg mL<sup>-1</sup>) e hepatócitos humanos primários (> 100 µg mL<sup>-1</sup>), após 48 h de tratamento (Carraz *et al.* 2015). Para o extrato de folhas de *P. alata* contra as células de leucemia linfoblástica aguda humana (CCRF-CEM), IC<sub>50</sub>: 91,2 µg mL<sup>-1</sup>, após 72 h de tratamento (Ozarowski *et al.* 2018). E para 4-hidroxi-2-ciclopentenona, um glicosídeo cianogênico, encontrado no extrato de folhas de *Passiflora tetrandra*, com atividade citotóxica contra células de leucemia murina (P388), foi obtido IC<sub>50</sub> menor que 1 µg mL<sup>-1</sup>, em ensaio por MTT (Perry *et al.* 1991).

Com base na avaliação da morfologia foi possível identificar que as células SW480 tratadas com os valores de IC<sub>50</sub> dos extratos SPE e SPS por 24h apresentaram um aumento no número de células vacuolizadas. Durante a apoptose a célula passa por mudanças morfológicas, entre elas, a retração da célula, a condensação da cromatina, a perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, a fragmentação do DNA e a formação dos corpos apoptóticos (Grivicich *et al.* 2007). Que podem ser os vacúolos observados, ou ainda esses vacúolos podem ser evidências de vesículas autofágicas. A autofagia é o principal mecanismo que medeia a entrega de várias cargas celulares aos lisossomos para degradação e reciclagem (Debnath *et al.* 2023). Associado a isso, quando avaliamos o ciclo celular utilizando os valores de IC<sub>90</sub> dos extratos SPE e SPS, também por 24h, observamos que o extrato SPE teve pouca influência na progressão do ciclo, enquanto o extrato SPS alterou significativamente as proporções das fases do ciclo, com destaque para um acúmulo de células de G2-M e aumento significativo da fragmentação do DNA. Não foi possível repetir o experimento de morte celular para a linhagem SW480, porém quando avaliamos o tipo de morte celular induzido pelo extrato SPS na linhagem B16F10 (IS = 2,64) identificamos a morte celular por apoptose em 87,6 % das células,

valor 7,6 vezes superior ao encontrado no controle. No ciclo celular de B16F10, o extrato SPS também contribuiu para um aumento de 76,23 % de DNA fragmentado.

O ácido oleanólico ou oleanico foi responsável pela inibição no crescimento de células cancerígenas HEPG-2 com alterações morfológicas típicas associadas à apoptose, incluindo encolhimento celular, bolhas de membrana, condensação nuclear e formação de corpos apoptóticos. Também foi observada a parada do ciclo celular na fase sub-G1 do ciclo celular (Zhu *et al.* 2015). Tais resultados são condizentes com as observações encontradas com o tratamento dos extratos de *Passiflora* nas células SW480, aonde também foram observadas alterações morfológicas associadas à apoptose e incremento de células na fase sub-G1, nomeada aqui como fragmentação do DNA.

O extrato etanólico de sementes de *Passiflora molissima* se mostrou ativo contra células de câncer de cólon humanas (HT-29), com IC<sub>50</sub>: 39,29 e 62,30 µg mL<sup>-1</sup>, após 48 e 72h, respectivamente (Ballesteros-Vivas *et al.* 2020). Valores menores do que observamos com SPE e SPS para linhagem SW480 que é similar, em origem, à HT-29. Porém diferente do que observamos para a linhagem celular VERO, o extrato de *P. molissima* exibiu um IC<sub>50</sub> baixo nas células normais CCD-18Co (88,08 µg mL<sup>-1</sup>), após 48h, levando o índice de seletividade a 2,23 (Ballesteros-Vivas *et al.* 2020) enquanto, no presente trabalho, SPE e SPS apresentaram 10,91 e 8,03 de seletividade para SW480. Kadochi *et al.* (2017) sugeriram que os ácidos graxos de cadeia média, presentes também nas sementes de *Passiflora*, reduzem a proliferação de células de câncer de cólon murinas (CT26) por meio da remodelação do metabolismo energético.

Segundo Regis e colaboradores (2015) as sementes de *P. edulis* apresentam teor lipídico entre 18,5 % e 29,4 %, com composição principal dos ácidos linoléico (55-66 %), oléico (18-20 %) e palmítico (10- 14 %). Os teores são influenciados por fatores climáticos, meio ambiente, local de cultivo, variedade cultivada e condições de plantio (Regis *et al.* 2015) e foram condizentes com os nossos achados. De fato, o ácido linoléico foi o principal constituinte identificado nos extratos SPE e SPS. Este é um ácido graxo insaturado essencial, conhecido também como ômega-6, precursor do ácido araquidônico que está envolvido na biossíntese de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (Wang *et al.* 2019).

Já foi descrito que as enzimas COX-2 e P450 são superexpressas na maioria dos cânceres de colon humano (Wang *et al.* 2019), indicando que a maior sensibilidade das células SW480 aos extratos de *Passiflora* pode ser em função de um maior recrutamento dos ácidos graxos, comparado as células VERO. O ácido linoléico também pode ser metabolizado em

ácido epoxioctadecamonoenóico pelas enzimas do citocromo P450 (CYP2C e CYP2J). O ácido epoxioctadecamonoenóico já mostrou efeitos pró-inflamatório, vasoconstritores, cardiodepressivo e citotóxico (Edin *et al.* 2020). Os ácidos palmítico e esteárico, identificados em baixas concentrações em SPE (4,32 e 2,36 %, respectivamente), também foram encontrados em extratos das folhas de *P. mucronata* analisados por GC-EM (da Silva *et al.* 2020).

Quando avaliamos o efeito do ácido palmítico na morfologia da linhagem 4T1 também observamos um aumento no número de células vacuolizadas e semelhante ao extrato SPE, o ácido palmítico teve pouco efeito no ciclo celular. Porém o efeito observado é condizente com o encontrado para o extrato SPS, com aumento de fragmentação do DNA e acúmulo de células na fase G2-M. Nessa fase ocorre o último check point do ciclo, ou seja, é a última chance de a célula impedir que a divisão ocorra sem os devidos reparos (Kernan *et al.* 2018). Isso, associado ao aumento de fragmentação, indica que os erros induzidos pelos tratamentos possivelmente não eram passíveis de reparo e as células podem ter sido marcadas para a morte celular. Porém é necessário repetir o ensaio de Anexina-V-FITC para confirmar essa hipótese.

Evidências sugerem um efeito adverso dos ácidos graxos poliinsaturados atribuídos ao ácido araquidônico e sua peroxidação lipídica em prostaglandinas (Williams *et al.* 2011). Porém, conforme revisaram Xu and Qian (2014), os efeitos dos ácidos graxos parecem depender das concentrações e linhagens celulares utilizadas, sendo o efeito anticâncer observado principalmente em altas concentrações e um efeito promotor do câncer observado em baixas concentrações. Os ácidos graxos essenciais ômega-6 como os ácidos linoléico,  $\gamma$ -linolênico, dihomog $\gamma$ -linolênico e araquidônico e o ácido graxo essencial ômega-3 ácido eicosapentaenóico, foram associados a atividades anticancerígenas com indução de apoptose e inibição da proliferação celular no câncer de mama induzido por 7,12-dimetilbenzantraceno e em células de câncer colorretal Caco-2 (Ramchurren and Karmali 1995; Dommels *et al.* 2003). Ácidos linoléicos conjugados também possuem atividade anticâncer conforme revisaram Dachev e colaboradores (2021).

Considerando as técnicas de extração (solvente: acetato de etila), material utilizado (sementes) e derivatização (esterificação e sililação) que utilizamos para a avaliação da composição química, não foi possível estabelecer com satisfação um perfil de componentes químicos, como teores de compostos fenólicos e flavonoides. As técnicas facilitam a identificação de ácidos graxos, como observamos, porém, outras substâncias já foram descritas para *P. edulis*.

O extrato de folhas de *P. edulis* coletas na Paraíba, utilizando acetato de etila como solvente, obteve maior concentração de fenóis totais  $56,86 \pm 1,75$  (mg g<sup>-1</sup> equivalente de ácido gálico) pelo método de Folin-Ciocalteu e flavonoides  $35,04 \pm 0,15$  (mg g<sup>-1</sup> equivalente de quercetina), comparado aos extratos hexânico e etanólico. Além disso, não promoveu morte significativa de esplenócitos de camundongos BALB/c (de Sousa *et al.* 2020). Através de análises CG-EM foram identificados luteolina, ácido p-cumárico e ácido caféico nos extratos de folhas de *P. edulis* (de Sousa *et al.* 2020). Park e colaboradores (2020) mostraram que o ácido caféico inibe o crescimento e a migração de populações de células-tronco cancerosas (CTC) colorretais, através da sinalização PI3K/Akt. As CTC foram identificadas em vários tipos de câncer, são resistentes às terapias tradicionais, como quimioterapia e radioterapia e estão implicadas com a dificuldade de cura (Park *et al.* 2020).

Componente de *P. edulis*, o éster fenetílico do ácido caféico reduziu a expressão de ciclina D1 e c-myc em células de câncer de cólon (HCT116 e SW480) e já foi descrito como um excelente inibidor da sinalização do fator beta catenina (Xiang *et al.* 2006). A beta catenina é uma proteína bifuncional que atua como transdutora do sinal intracelular na via de sinalização Wnt, modulando diversos processos celulares incluindo proliferação, sobrevivência, apoptose, diferenciação, adesão celular e motilidade. Encontra-se superexpressa no câncer colorretal podendo atuar na destruição das proteínas axina 1, adenomatous polyposis coli (APC), caseína quinase 1 (CK1 – regulação do reparo do DNA) e glicogênio sintase quinase 3β (GSK3β) (White *et al.* 2012; Bourroul *et al.* 2016). Ácido caféico, ácido p-cumárico e luteolina também possuem atividades antiinflamatórias (Pragasam *et al.* 2013) e imunomoduladora (Kotanidou *et al.* 2002).

Durante o envelhecimento e a carcinogênese se observam taxas anormais de inflamação, que têm sido associadas à: transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão e metástase (Reuter *et al.*, 2010). Foi demonstrado que produtos naturais têm a capacidade de impedir a secreção de fatores pró-inflamatórios (Shayganni *et al.* 2015). Diversas espécies da família Passiflora incluindo *Passiflora foetida* (Park *et al.* 2018), *Passiflora nitida* (Montefusco-pereira *et al.* 2013), *Passiflora alata* (Figueiredo *et al.* 2016) e *Passiflora cincinnata* (de Lavor *et al.* 2018) já possuem atividade anti-inflamatória descritas na literatura.

Como observamos, extratos de sementes de *P. edulis* e *P. setacea* apresentam atividade citotóxica contra melanoma e câncer colorretal com satisfatórias seletividades. Além de contribuir para aumentar as informações acerca do potencial anticâncer dos produtos naturais

de *Passiflora*, esses achados também agregam valor as sementes de espécies frutíferas que são usualmente descartadas no processamento industrial.

## 5 CONCLUSÃO

Os extratos das sementes de *P. edulis* e *P. setacea* se mostraram ricos nos ácidos graxos linoléico, oleico e palmítico e exibiram seletividades satisfatórias contra o melanoma murino (IS de SPS = 2,64) e contra o câncer colorretal humano nos quais as seletividades chegaram a 8,03 para o extrato SPS e 10,91 para o extrato SPE. O ácido palmítico exibiu seletividade de 2,19 para o câncer de mama murino. O mecanismo de ação de SPS parece envolver a ativação da morte celular por apoptose com a vacuolização das células e fragmentação do DNA. Esses achados indicam que os extratos de sementes de *P. edulis* e *P. setacea*, ricos em ácidos graxos, possuem atividade antitumoral com seletividades promissoras e podem ser considerados no desenvolvimento de quimioterápicos de origem natural.

## REFERÊNCIAS

- Adams RP (2007) **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Amaral RG, Gomes SVF, Andrade LN, et al (2020) **Cytotoxic, antitumor and toxicological profile of passiflora alata leaf extract**. *Molecules* 25:.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25204814>
- Amaral RG, Gomes SVF, Luciano MC dos S, et al (2019) **Cytotoxic potential of 14 Passiflora species against cancer cells**. *J Med Plants Res* 13:157–166.  
<https://doi.org/10.5897/jmpr2019.6744>
- Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R (2009) **Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs**. *Int J Biomed Sci* 5:1–11
- Ampasavate C, Okonogi S, Anuchapreeda S (2010) **Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines**. *African J Pharm Pharmacol* 4:013–021
- Arung ET, Kusuma IW, Christy EO, et al (2009) **Evaluation of medicinal plants from Central Kalimantan for antimelanogenesis**. *J Nat Med* 63:473–480.  
<https://doi.org/10.1007/s11418-009-0351-7>
- Ataíde EM, Oliveira JCDE, Ruggiero C (2012) **Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre Passiflora setacea d . c . cultivado em jaboticabal, SP**. *Rev Bras Frutic* 34:377–381
- Baeta JVPB, Andrade UMS, Oliveira RM, Oliveira L (2021) **Allyl Dibenzoylmethane**

**Derivative: Antimelanoma Activity and Study of Its Molecular Mechanism of Interaction with DNA.** J Braz Chem Soc 32:1491–1497

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) **Biological effects of essential oils - A review.** Food Chem Toxicol 46:446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Ballesteros-Vivas D, Alvarez-Rivera G, León C, et al (2020) **Foodomics evaluation of the anti-proliferative potential of Passiflora mollissima seeds.** Food Res Int 130:108938. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108938>

Bernacci LC, Cervi AC, Milward-de-Azevedo MA, Nunes TS, Imig DC, Mezzonato AC (2013) **Passifloraceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

Barrales FM, Rezende CA, Martínez J (2015) **The Journal of Supercritical Fluids Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of passion fruit ( Passiflora edulis sp .) seed oil assisted by ultrasound.** J Supercrit Fluids 104:183–192. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.06.006>

Bézivin C, Tomasi S, Dévéhat FL, Boustie J (2003) **Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines.** Phytomedicine 10 10:499–503

Blowman K, Magalhães M, Lemos MFL, et al (2018) **Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products.** Evidence-based Complement Altern Med 2018:.. <https://doi.org/10.1155/2018/3149362>

Bourroul GM, Fragoso HJ, Gomes JWF, et al (2016) **The destruction complex of beta-catenin in colorectal carcinoma and colonic adenoma.** einstein 14:135–142. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082016AO3678>

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al (2018) **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** CA Cancer J Clin 68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Carraz M, Lavergne C, Jullian V, et al (2015) **Antiproliferative activity and phenotypic modification induced by selected Peruvian medicinal plants on human hepatocellular carcinoma Hep3B cells.** J Ethnopharmacol 166:185–199. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.028>

Costa GM, Cárdenas PA, Gazola AC, et al (2015) **Isolation of C- glycosylflavonoids with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from Passiflora bogotensis Benth by gradient high-speed counter-current chromatography.** J Chromatogr B 990:104–110. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.015>

Dachev M, Bryndová J, Jakubek M, et al (2021) **The effects of conjugated linoleic acids on cancer.** Processes 9:1–17. <https://doi.org/10.3390/pr9030454>

da Silva ICV, de Oliveira PF, Barbosa GM, et al (2020) **Passiflora mucronata leaves extracts obtained from different methodologies: A phytochemical study based on cytotoxic and apoptosis activities of triterpenes and phytosterols constituents.** Brazilian J Pharm Sci 56:.. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000417666>

da Silva ICV, Kaluđerović GN, de Oliveira PF, et al (2018) **Apoptosis Caused by**

**Triterpenes and Phytosterols and Antioxidant Activity of an Enriched Flavonoid Extract from *Passiflora mucronata*.** *Anticancer Agents Med Chem* 18:1405–1416. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180315090949>

Das S, Dutta M, Chaudhury K (2016) **Metabolomic and chemometric study of *Achras sapota* L . fruit extracts for identification of metabolites contributing to the inhibition of  $\alpha$  - amylase and  $\alpha$  - glucosidase.** *Eur Food Res Technol* 242:733–743. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2581-0>

Debnath J, Gammoh N, Ryan KM (2023) **Autophagy and autophagy-related pathways in cancer.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 24:560-575. 10.1038/s41580-023-00585-z.

de Lavor ÉM, Leal AEBP, Fernandes AWC, et al (2018) **Ethanollic extract of the aerial parts of *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) reduces nociceptive and inflammatory events in mice.** *Phytomedicine* 47:58–68. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.052>

de Sousa GF, Santos DKD do N, da Silva RS, et al (2020) **Evaluation of cytotoxic, immunomodulatory effects, antimicrobial activities and phytochemical constituents from various extracts of *Passiflora edulis* F. flavicarpa (Passifloraceae).** *Nat Prod Res* 0:1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1798660>

Denipote FG, Trindade EBSM, Burini RC (2010) **Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon.** *Arq Gastroenterol* 47:93–98

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A (2004) **Passiflora: A review update.** *J Ethnopharmacol* 94:1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>

Dheeban Shankar P, Basker S, Karthik S (2017) **In Vitro cytotoxic and apoptotic effect of *Passiflora Foetida* against cervical cancer cells and its fourier transform infrared profiling.** *Asian J Pharm Clin Res* 10:46–49. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i11.20226>

Dommels YEM, Haring MMG, Keestra NGM, et al (2003) **The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE2 synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines.** *Carcinogenesis* 24:385–392. <https://doi.org/10.1093/carcin/24.3.385>

Duarte I de AE, Milenkovic D, Borges TKS, et al (2020) **Acute Effects of the Consumption of *Passiflora setacea* Juice on Metabolic Risk Factors and Gene Expression Profile in Humans.** *Nutrients* 12:1–20

Edin ML, Duval C, Zhang G, Zeldin DC (2020) **Role of linoleic acid-derived oxylipins in cancer.** *Cancer Metastasis Rev.* 39: 581-582.

Figueiredo D, Colomeu TC, Schumacher NSG, et al (2016) **Aqueous leaf extract of *Passiflora alata* Curtis promotes antioxidant and anti-inflammatory effects and consequently preservation of NOD mice beta cells (non-obese diabetic).** *Int Immunopharmacol* 35:127–136. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.031>

Garcia-Garcia G, Stone J, Rahimifard S (2019) **Opportunities for waste valorisation in the food industry – A case study with four UK food manufacturers.** *J Clean Prod* 211:1339–

1356. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.269>

Gomes NGM, Campos MG, Órfão JMC, Ribeiro CAF (2009) **Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery**. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 33:1372–1389. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.07.033>

He X, Luan F, Yang Y, et al (2020) *Passiflora edulis* : **An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology**. *Front Pharmacol* 11:1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00617>

Hong EH, Heo EY, Song JH, et al (2017) **Trans-scirpusin A showed antitumor effects via autophagy activation and apoptosis induction of colorectal cancer cells**. *Oncotarget* 8:41401–41411. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17388>

INCA (2022) **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro : INCA, 2022. In: Portal INCA

Iqbal J, Abbasi BA, Mahmood T, et al (2017) **Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach**. *Asian Pac J Trop Biomed* 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.016>

Kadochi Y, Mori S, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Nishiguchi Y, Kishi S, Fujui K, Ohmori H, Kuniyasu H (2017) **Remodeling of energy metabolism by a ketone body and medium-chain fatty acid suppressed the proliferation of CT26 mouse colon cancer cells**. *Oncol Lett* 14: 673-680. doi: 10.3892/ol.2017.6195

Kernan J, Bonacci T, Emanuele MJ (2018) **Who guards the guardian? Mechanisms that restrain APC/C during the cell cycle**. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1865:1924–1933. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.09.011>

Kido LA, Hahm E-R, Kim S-H, et al (2020) **Prevention of Prostate Cancer in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Mice by Yellow Passion Fruit Extract and Antiproliferative Effects of Its Bioactive Compound Piceatannol**. *J Cancer Prev* 25:87–99. <https://doi.org/10.15430/jcp.2020.25.2.87>

Kotanidou A, Xagorari A, Bagli E, et al (2002) **Luteolin Reduces Lipopolysaccharide-induced Lethal Toxicity and Expression of Proinflammatory Molecules in Mice**. *Am J Respir Crit Care Med* 165:818–823. <https://doi.org/10.1164/rccm.2101049>

Kuete V, Dzotam JK, Voukeng IK, et al (2016) **Cytotoxicity of methanol extracts of *Annona muricata*, *Passiflora edulis* and nine other Cameroonian medicinal plants towards multi-factorial drug-resistant cancer cell lines**. *Springerplus* 5:. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3361-4>

Kumar B, Smita K, Cumbal L, et al (2015) **Pomosynthesis and biological activity of silver nanoparticles using *Passiflora tripartita* fruit extracts**. *Adv Mater Lett* 6:127–132. <https://doi.org/10.5185/amlett.2015.5697>

Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD (2018) **Analysis of Cell Viability by the MTT Assay**. *Cold Spring Harb Protoc* 469–472. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

Lourith N, Kanlayavattanakul M (2013) **Antioxidant activities and phenolics of *Passiflora***

**edulis seed recovered from juice production residue.** *J Oleo Sci* 62:235–240. <https://doi.org/10.5650/jos.62.235>

Lui P, Cashin R, Machado M, et al (2007) **Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials.** *Cancer Treat Rev* 33:665–680. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.06.004>

Ma W, Liu X, Du W (2019) **Baicalin induces apoptosis in SW480 cells through downregulation of the SP1 transcription factor.** *Anticancer Drugs* 30:153–158. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000708>

Ma WD, Zou YP, Wang P, et al (2014) **Chimaphilin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway.** *Food Chem Toxicol* 70:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.014>

Matsui Y, Sugiyama K, Kamei M, et al (2010) **Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis.** *J Agric Food Chem* 58:11112–11118. <https://doi.org/10.1021/jf102650d>

Martínez R, Torres P, Meneses MA, et al (2012) **Chemical , technological and in vitro antioxidant properties of mango , guava , pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate.** *Food Chem* 135:1520–1526. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.057>

Meletti LMM (1998) **Caracterização agronômica de progênies de maracujá- amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener).**

Montefusco-pereira CV, Carvalho MJ De, Paula A, et al (2013) **Antioxidant , Anti-inflammatory , and Hypoglycemic Effects of the Leaf Extract from *Passiflora nitida* Kunth.** *Appl Biochem Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0271-6>

Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, et al (2004) **Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line.** *Fitoterapia* 75:375–377. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.01.010>

Mota NSRS, Kwiecinski MR, Zeferino RC, et al (2018) **In vivo antitumor activity of by-products of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Rich in medium and long chain fatty acids evaluated through oxidative stress markers, cell cycle arrest and apoptosis induction.** *Food Chem Toxicol* 118:557–565. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.010>

Nascimento FR, Moura TA, Baeta JVPB, et al (2018) **New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA.** *Biophys Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.009>

Osma JA, Maldonado ME, Chamorro NL, et al (2005) **Antioxidant and antiproliferative activity of ethanolic and aqueous extracts from leaves and fruits juice *Passiflora edulis*.** *Perspect Nut Hum* 15:13–25

Ozarowski M, Piasecka A, Paszel-Jaworska A, et al (2018) **Comparison of bioactive compounds content in leaf extracts of *Passiflora incarnata*, *P. caerulea* and *P. alata* and in vitro cytotoxic potential on leukemia cell lines.** *Rev Bras Farmacogn* 28:179–191. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.01.006>

- Park J, Kwon O, Ryu HW, et al (2018) **Anti-inflammatory effects of *Passiflora foetida* L. in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages.** *Int J Mol Med* 41:3709–3716. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3559>
- Park S, Kim S, Hong I, Lee H (2020) **A Novel Therapeutic Approach for Colorectal Cancer Stem Cells : Blocking the PI3K / Akt Signaling Axis With Caffeic Acid.** *Front Cell Dev Biol* 8:1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.585987>
- Perry NB, Albertson GD, Blunt JW, et al (1991) **4-Hydroxy-2-cyclopentenone: An anti-Pseudomonas and cytotoxic component from *Passiflora tetrandra*.** *Planta Med* 57:129–131. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960048>
- Pragasam SJ, Venkatesan V, Rasool M (2013) **Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effect of p-Coumaric Acid , a Common Dietary Polyphenol on Experimental Inflammation in Rats.** *Inflammation* 36:169–176. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9532-8>
- Rabello S, Miranda L, Perei- MC, et al (2017) **Caracterização e avaliação da atividade fungicida de extrativos de madeira em fungos do gênero *Trichoderma* e *Rhizoctonia*** **Characterization and evaluation of fungicide activity of wood extractives in *Trichoderma* and *Rhizoctonia*.** *Nat online* 15:1–7
- Ramchurren N, Karmali R (1995) **Effects of Gamma-linolenic and Dihomo-gamma-linolenic Acids on 7,12- Dimethylbenz(alpha)anthracene-Induced Mammary Tumors in Rats.** 95–101
- Ramirez V, Arango SS, Maldonado ME, et al (2019) **Biological activity of *Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* ethanolic leaves extract on human colonic adenocarcinoma cells.** *J Appl Pharm Sci* 9:64–71. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2019.90209>
- Ramírez V, Arango SS, Uribe D, et al (2017) **Effect of the ethanolic extract of *Passiflora edulis* F. *Flavicarpa* leaves on viability, cytotoxicity and apoptosis of colon cancer cell lines.** *J Chem Pharm Res* 9:135–139
- Ranganath RM, Nagashree NR (2001) **Role of programmed cell death in development.** *Int Rev Cytol* 202:159–242. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)02005-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)02005-8)
- Regis SA, Resende ED De, Antoniassi R (2015) **Oil quality of passion fruit seeds subjected to a pulp-waste purification process.** *Crop Prod* 45:977–984
- Reuter, Simone; Gupta, Subash C.; Chaturvedi, Madan M.; Aggarwal BB (2010) **Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?** *Free Radic Biol Med* 49:1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.Oxidative
- Rivas-Mena KE, Muñoz DL, Pino-Benítez CN, Balcázar-Morales N (2015) **Actividad antioxidante, contenido fenólico total y citotoxicidad de extractos polares obtenidos de plantas antidiabéticas colombianas.** *Rev Cuba Plantas Med* 20:277–289
- Rowe CA, Nantz MP, DeNiera C, et al (2004) **Inhibition of neoplastic transformation of benzo[α]pyrene-treated BALB/c 3T3 murine cells by a phytochemical extract of passionfruit juice.** *J Med Food* 7:402–407. <https://doi.org/10.1089/jmf.2004.7.402>

- Sabino LBS, Gonzaga MLC, Oliveira LS, et al (2020) **Polysaccharides from acerola, cashew apple, pineapple, mango and passion fruit co-products: Structure, cytotoxicity and gastroprotective effects.** *Bioact Carbohydrates Diet Fibre* 24:.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2020.100228>
- Sanchez BAO, Celestino SMC, Gloria MB de A, et al (2020) **Pasteurization of passion fruit *Passiflora setacea* pulp to optimize bioactive compounds retention.** *Food Chem X* 6:.  
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100084>
- Santana FC De, Shinagawa FB, Araujo E da S, et al (2015) **Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Brazilian Passiflora Seed Oils.** *J Food Sci* 80:2647–2654.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13102>
- Shayganni E, Bahmani M, Asgary S, Rafieian-kopaei M (2015) **Inflammaging and cardiovascular disease : Management by medicinal plants.** *Phytomedicine.*  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.11.004>
- Silva DC, Freitas ALP, Barros FCN, et al (2012) **Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties.** *Carbohydr Polym* 87:139–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.029>
- Stirpe F, Bolognesi A, Bortolotti M, et al (2007) **Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla* (Passifloraceae).** *Toxicon* 50:94–105. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.02.020>
- Storz P (2005) **Reactive oxygen species in tumor progression.** *Front Biosci* 10:1881–1896
- Suffredini IB, Paciencia MLB, Varella AD, Younes RN (2006) **In vitro prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts.** *Pharmazie* 61:722–724
- Suffness M, Pezzuto JM. **Assays related to cancer drug discovery.** In: Hostettmann K, editor. **Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity.** London: Academic Press; 1990. pp. 71–133
- Sujana N, Ramanathan S, Vimala V, et al (2012) **Antitumour potential of *Passiflora incarnata*.L against ehrlich ascites carcinoma.** *Int J Pharm Pharm Sci* 4:17–20
- Thu NB, Trung TN, Ha DT, et al (2010) **Screening of Vietnamese medicinal plants for cytotoxic activity.** *Nat Prod Sci* 16:43–49
- Wang R-L, Gao Y, Zing X (2020) **Analysis of Chemical Composition and Assessment of Antioxidant, Cytotoxic and Synergistic Antibacterial Activities of Essential Oils from Different Plant Parts of *Piper boehmeriifolium*.** *Chem Biodivers* 17:.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.202000245>
- White BD, Chien AJ, Dawson DW (2012) **Dysregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Gastrointestinal Cancers.** *Gastroenterology* 142:219–232.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.001>.Dysregulation
- Williams CD, Whitley BM, Hoyo C, et al (2011) **A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer.** *Nutr Res* 31:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.01.002>

Xiang D, Wang D, He Y, et al (2006) **Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the b -catenin / T-cell factor signaling.** Anticancer Drugs 17:753–762

Xu Y, Qian S (2014) **Anti-cancer activities of  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids.** Biomed J 37:112–119. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.131378>

Yamamoto T, Sato A, Takai Y, et al (2019) **Effect of piceatannol-rich passion fruit seed extract on human glyoxalase I-mediated cancer cell growth.** Biochem Biophys Reports 20:100684. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100684>

Yasui H, Sakurai H (2003) **Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light.** Exp Dermatol 12:655–661

Zhang J, Koike R, Yamamoto A, et al (2013) **Glycosidic inhibitors of melanogenesis from leaves of *Passiflora edulis*.** Chem Biodivers 10:1851–1865. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300181>

Zhu YY, Huang HY, Wu YL (2015) **Anticancer and apoptotic activities of oleanolic acid are mediated through cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential in HEPG-2 human hepatocellular carcinoma cells.** Mol Med Rep 12:5012–5018. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4033>

## **CAPÍTULO 2: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cyanocephalus rugosus* e *Cantinoa carpinifolia* (LAMIACEAE)**

O objetivo deste trabalho foi descrever a composição química e a atividade anticancer dos óleos essenciais de *Cyanocephalus rugosus* (CR) e *Cantinoa carpinifolia* (CC), coletadas no Cerrado Mineiro. Os óleos essenciais foram obtidos de folhas e flores em conjunto (CR), apenas das folhas (CRF), das flores (CC Flor) e das folhas (CC Folha) por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/EM). A atividade citotóxica dos óleos foi avaliada através de ensaio de MTT nas linhagens de melanoma murino (B16F10), câncer de mama murino (4T1), melanócitos normais murinos (melan-a), epitélio de rim normal de macaco verde africano (VERO), câncer colorretal humano (SW480) e câncer de fígado humano (HEPG-2), para o cálculo dos valores de IC<sub>50</sub> e os índices de seletividade (IS). A avaliação dos compostos majoritários mostrou que no óleo CR estes foram: β-cariofileno (22,84 %), Germacreno D (19,97 %), α-Acoradieno (11,71 %), Espatulenol (8,30 %) e Tau-cadinol (5,30 %); no óleo CRF identificamos: Germacreno D (16,11 %), β-cariofileno (12,51 %), Espatulenol (12,16 %), α-Acoradieno (11,98 %) e Óxido de cariofileno (6,49 %); no óleo CC Flor: α-Tujona (43,13 %), Sabineno (8,86 %), Espatulenol (7,92 %), Óxido de cariofileno (5,41 %) e β-Tujona (5,13 %) e no óleo CC Folha, α-Tujona (46,04 %), Espatulenol (6,72 %), Sabineno (6,06 %), Isocariofileno (5,09 %) e α-Copaeno (4,79 %). Os valores de IS para o óleo de folhas e flores de *C. rugosus* foram 0,64; 1,11, 1,89 e 4,72 para B16F10, 4T1, SW480 e HEPG-2, respectivamente, enquanto o óleo de folhas de CR exibiu IS iguais a 1,45 e 1,60 contra SW480 e HEPG-2, respectivamente. O óleo das flores de *C. carpinifolia* exibiu seletividades de 0,27; 0,26 e 2,71 e o óleo das suas folhas exibiu IS de 0,43; 0,48 e 1,28 contra B16F10, 4T1 e SW480, respectivamente. O mecanismo de ação identificado para o óleo CRF nas células HEPG-2 foi morte celular por apoptose com fragmentação do DNA enquanto os demais tratamentos não diferiram significativamente do controle. Apesar da identificação de morte celular por meio da análise de morfologia celular por microscopia de luz, nossos resultados indicam que, *in vitro*, os óleos de folhas e flores de CR e das flores de CC apresentam satisfatórias seletividades contra o câncer de fígado e colorretal humanos, respectivamente, desta forma, possuem potencial para testes mais refinados na busca por compostos naturais com atividade anticancer. Além disso, descrevemos pela primeira vez a composição química do óleo essencial de *C. rugosus* e comparamos o óleo essencial de diferentes partes de ambas as plantas, contribuindo significativamente para o conhecimento químico dessas espécies.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ -Tujona.  $\beta$ -cariofileno. Espatuleno. *Hyptis*. MTT. Rosmarinho.

## 1 INTRODUÇÃO

Derivados de plantas como extratos, tinturas e óleos essenciais vêm sendo utilizados medicinalmente desde a idade média (Bakkali *et al.* 2008) e já demonstraram capacidade antimutagênica, antiproliferativa, antioxidante e desintoxicante, atuando em diversas vias metabólicas das células cancerosas. Também se observou ausência ou redução da citotoxicidade em células saudáveis (Blowman *et al.* 2018) indicando a existência de seletividade. Apesar do princípio “alvo único, composto único” utilizado pela indústria farmacêutica dificultar o desenvolvimento de terapias à base de produtos naturais, sua grande complexidade de constituintes desperta interesse (Bakkali *et al.* 2008).

A família Lamiaceae, mesma família do manjericão, menta, hortelã, tomilho e outros, se destaca como uma fonte promissora de metabólitos bioativos, em especial as espécies da subtribo Hyptidinae (Bridi *et al.* 2021). Esta subtribo atualmente contém 19 gêneros e cerca de 400 espécies principalmente na América tropical (Harley and Pastore 2012). Várias plantas desse táxon são cobertas por tricomas glandulares nas superfícies foliares, caules e inflorescências (Harley and Pastore 2012), responsáveis pela produção e armazenamento de óleos essenciais com atividade biológica (Pinheiro *et al.* 2015). Avaliações fitoquímicas já revelaram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, lignanas, ácidos fenólicos e  $\alpha$ -pironas compondo esses óleos (Bridi *et al.* 2021).

O gênero *Hyptis*, o maior da subtribo Hyptidinae com mais de 300 espécies, é composto por ervas, subarbustos, arbustos e, mais raramente, pequenas árvores (Sedano-Partida *et al.* 2020). Possui uma diversidade de atividades biológicas descritas, incluindo atividades antibacteriana e anti-HIV para *Hyptis radicans* e *Hyptis multibracteata* (Sedano-partida *et al.* 2020) e atividade citotóxica contra diferentes células cancerosas: *Condea tomentosa* – KB e P-388 (Kingston 1977), *Hyptis capitata* - HCT-8 (Yamagishi *et al.* 1988), *Medusantha martiusii* – NCTC clone 929 (de Figueirêdo *et al.* 2018b) e *Cantinoa stricta* - MCF-7 (Scharf *et al.* 2016).

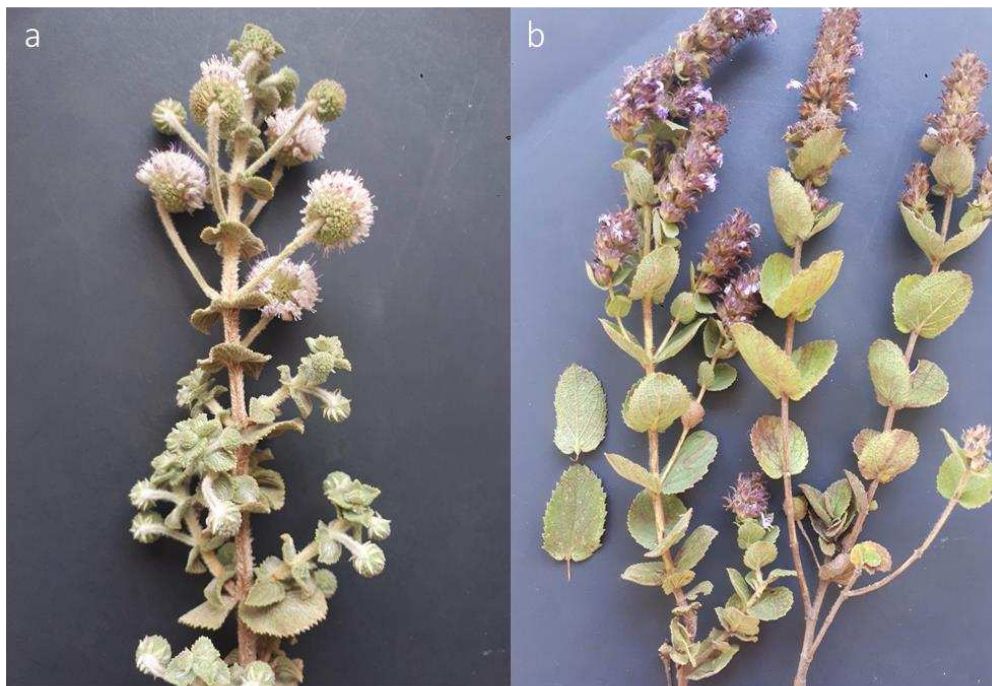
Os medicamentos anticâncer semissintéticos teniposídeo e etoposídeo têm como precursores a lignina podofilotoxina (Medrado *et al.* 2015), apresentam melhores efeitos antitumorais, com menor toxicidade, e são utilizados no tratamento de cânceres de testículo e de pulmão (Gordaliza *et al.* 2004). A podofilotoxina já foi identificada em diversas espécies de Lamiaceae, incluindo *Eriope macrostachya* (Raffaeuf *et al.* 1986), *Eriope blanchetii* (David *et al.* 2001; Santos *et al.* 2011), *Eriope latifolia* (Santos *et al.* 2011), *Oocephalus crassifolius*,

*Leptohyptis calida*, *Cyanocephalus rugosus*, *Eriope hypenioides* e *Eriope exaltata* (Brandão *et al.* 2016).

*Cyanocephalus rugosus* (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore é uma espécie típica dos cerrados do Brasil e com poucos registros na Caatinga e Mata Atlântica (Mota *et al.* 2020). Possui diversos sinônimos incluindo o homótipo *Hyptis rugosa* Benth., 1833 e apresenta folhas opostas simples, inflorescências compostas de cimeiras terminais e produção de óleos essenciais altamente odoríferos (Mota *et al.* 2020). Entre os metabólitos secundários descritos para a espécie, a lignina podofilotoxina se destaca (Brandão *et al.* 2016).

Popularmente conhecida como “rosmarinho” e “mata-pasto”, a espécie *Cantinoa carpinifolia* Benth é um arbusto ramificado com inflorescências grandes, em espiga terminal com 1-2 cm de diâmetro, flores violetas e brácteas lineares-lanceoladas entre as flores. Encontra-se distribuída no Brasil (Tocantins, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo), Bolívia e Peru (De Sá *et al.* 2016). Possui como sinônimo botânico *Hyptis carpinifolia* e odor marcante, evidenciando a presença de óleos essenciais. Suas folhas têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de resfriados, gripes e reumatismo (Silva *et al.* 2011).

Figura 1 - *Cyanocephalus rugosus* (a) e *Cantinoa carpinifolia* (b)



Fonte: A autora.

O óleo essencial das folhas de *C. carpinifolia* já demonstrou variação sazonal na composição química, dependendo do índice pluviométrico, com os principais constituintes sendo 1,8-cineol (39,6 %-61,8 %), trans-cadin-1(6),4-dieno (2,8 %-17,5 %),  $\beta$ -cariofileno (4,4 %-10,0 %), prenopsan-8-ol (4,2 %-9,6 %) e  $\beta$ -pineno (2,9 %-5,3 %) (De Sá *et al.* 2016). Em um outro estudo, avaliando a composição desse óleo essencial foram encontradas altas concentrações dos monoterpenos  $\alpha$ -tujona (38,14 %) e  $\beta$ -tujona (22,43 %), além de  $\beta$ -cariofileno (7,28 %), cis-pinocanfeno (5,55 %), sabineno (5 %) e germacreno-D (4,35 %). Constituintes relacionados a sua atividade antibacteriana, onde a concentração mínima bactericida foi 6,25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  em *Escherichia coli* e 0,39  $\mu\text{L mL}^{-1}$  em *Staphylococcus aureus* (Camargo *et al.* 2019).

Relativamente poucas espécies do gênero *Hyptis* foram investigadas do ponto de vista químico e farmacológico (Bridi *et al.* 2021). Sabendo-se que os óleos essenciais de espécies do gênero *Hyptis* possuem classes de compostos dotados de atividades biológicas relevantes, nosso objetivo foi avaliar o potencial antiproliferativo dos óleos essenciais de *C. rugosus* e *C. carpinifolia*, coletados no Cerrado mineiro, sobre células cancerosas e normais. Além disso, avaliar pela primeira vez, a composição química do óleo essencial de *C. rugosus* e comparar as composições dos óleos extraídos de *C. carpinifolia*, a partir das suas partes reprodutivas (flores) e vegetativas (folhas).

Os objetivos específicos foram extrair por hidrodestilação e identificar cromatograficamente os compostos voláteis de *C. rugosus* e de *C. carpinifolia*; Cultivar diferentes linhagens de células normais e cancerosas: VERO, melan-a, SW480, B16F10 e 4T1; Avaliar o potencial citotóxico dos óleos essenciais em concentrações decrescentes em ensaio de MTT (com todas as linhagens) para obtenção de dados de  $\text{IC}_{50}$  e índice de seletividade desses; além de investigar, por citometria de fluxo, o tipo de morte, os efeitos no ciclo celular e as mudanças morfológicas dos tratamentos com seletividades superiores a 2.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta das plantas e extração dos óleos essenciais

As plantas de *C. rugosus* e *C. carpinifolia* foram coletadas no período da tarde, durante a floração, em junho de 2021 no município de Rio Paranaíba – MG, situado no bioma Cerrado. Em um segundo momento, no período da manhã em janeiro de 2023, plantas de *C. rugosus*

foram coletadas fora do período de floração. As espécies foram gentilmente identificadas pelo Professor Dr. José Floriano Barêa Pastore da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e as exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC) com os registros: 54.603 - *C. rugosus* e 54604 - *C. carpinifolia*.

Os óleos essenciais foram obtidos no Laboratório de Desenvolvimento de Agroquímicos Naturais, localizado no Centro Integrado de Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba (LDAN-CIP/UFV-CRP). As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia (LC-CIP/UFV-CRP), e os ensaios celulares *in vitro* foram realizados no Laboratório de pesquisas aplicadas ao câncer (LAPAC/DPF) na Universidade Federal de Viçosa – Campus Viçosa (UFV- CAV)

Foram utilizadas as folhas e flores secas, à temperatura ambiente, das duas espécies. Em função da dificuldade em separar as mesmas, na espécie *C. rugosus*, primeiramente, o óleo essencial foi obtido de folhas e flores juntas (CR). Em um segundo momento, foram utilizadas apenas as folhas de *C. rugosus* (CRF). Enquanto na *C. carpinifolia* foram obtidos os óleos essenciais das folhas (CC Folhas) e das flores (CC Flores), isoladamente. O material seco (100 g) foi triturado por turbólise (liquidificador) com 500 mL de água e o produto foi transferido para um balão de fundo redondo de 1 L que foi acoplado a um aparelho Clevenger modificado (Figura 2).

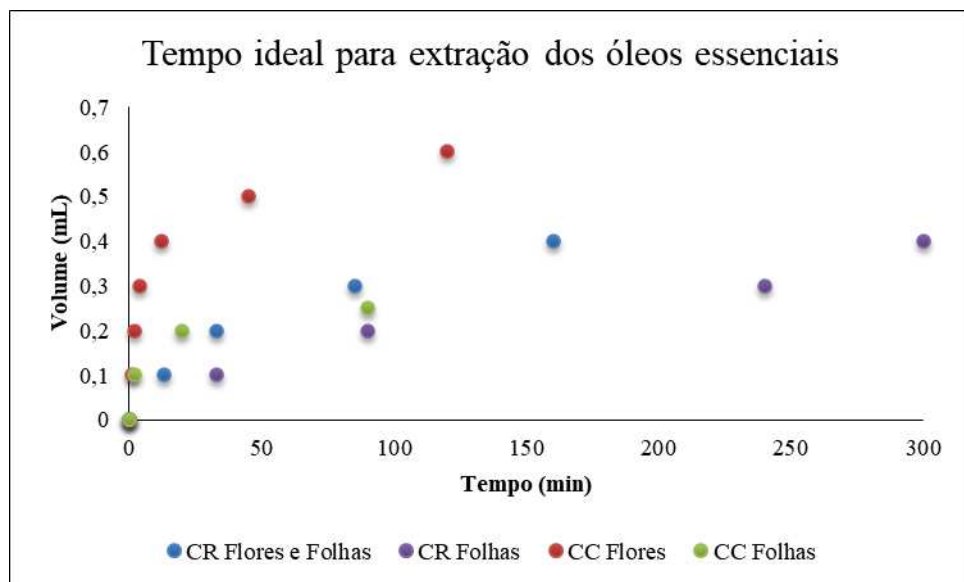
Figura 2 - Aparelho de Clevenger



Fonte: A autora.

A princípio foi realizado um estudo para determinar o tempo ideal de extração dos óleos essenciais (Figura 3). O tempo ideal foi determinado de acordo com o maior volume extraído no menor tempo possível. Observamos que após 60 minutos de hidrodestilação, as folhas e flores de *C. rugosus* apresentavam um rendimento de 0,3 mL de óleo tendo demorado mais 60 minutos para alcançar 0,4 mL. Quando extraído o óleo apenas das folhas de *C. rugosus*, o mesmo volume (0,4 mL) foi alcançado apenas após 300 minutos de hidrodestilação. As flores da espécie *C. carpinifolia* tiveram rendimento de 0,5 mL de óleo antes de alcançar 60 minutos de extração e demoraram mais 60 minutos para alcançar 0,6 mL de óleo, enquanto as folhas obtiveram um rendimento de 0,2 mL antes de 60 minutos e não alcançaram 0,3 mL mesmo depois de mais 60 minutos de hidrodestilação. Com isso, as extrações subsequentes foram realizadas com amostras de 100 g do material vegetal no tempo de 180 min, para os óleos de flores e folhas *C. de rugosus*, bem como as folhas e flores de *C. carpinifolia* e no tempo de 300 minutos para as folhas de *C. rugosus*, em função do volume de óleo não ter aumentado significativamente após esses tempos.

Figura 3 - Tempo ideal de extração dos óleos essenciais



CR: *C. rugosus*, CC: *C. carpinifolia*. Fonte: A autora.

Para o cálculo de rendimento dos óleos essenciais, foi utilizado o volume obtido por 100 g de material vegetal seco. O óleo essencial foi separado da água por funil de separação e armazenado a  $-15^{\circ}\text{C}$ , protegido da luz, até o momento das análises.

## 2.2 Composição química dos óleos essenciais de *C. rugosus* e *C. carpinifolia*

A análise química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM, Shimadzu, QP2010Plus). Uma coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase estacionária RTX5 (0,25 µm de espessura do filme) foi utilizada com as seguintes características operacionais: hélio como gás de arraste a 1,0 mL / min; temperatura forno programada inicialmente a 60 °C, com elevação de 2 °C por minuto até atingir 200 °C, quando iniciou elevação de 5 °C por minuto até 280 °C. A temperatura do injetor, modelo AOC-20i Shimadzu, foi de 220 °C; e do detector foi 240 °C; empregou-se injeção com razão split 1:20 e varredura de fragmentos de 45 a 600 (m/z), volume de injeção 1 µL de uma solução, de diclorometano, com concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup>.

As substâncias foram identificadas por comparação dos seus espectros de massas com a biblioteca de espectros de massa Wiley 6.0 (EUA) do equipamento e, também, pela comparação dos índices aritméticos com a literatura (ADAMS, 2007). Os índices aritméticos (AI) foram calculados (Equação 1) após injeção de uma mistura de padrões de alcanos série homóloga de C7 (heptano) a C30 (tridecano) nas mesmas condições cromatográficas dos óleos essenciais. A concentração relativa das substâncias foi obtida pelo cálculo de seu percentual relativo, através da razão entre a área da integral dos respectivos picos, e a área total de todos os constituintes da amostra (Nunes *et al.* 2021).

$$AI = 100Pz + 100 \left[ \frac{(RTx - RTPz)}{(RT(Pz+1) - RTPz)} \right] \quad \text{Equação (1)}$$

Sendo que:

X: Componente de interesse;

Pz: Número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de x;

RTx: Tempo de retenção de x;

RTPz: Tempo de retenção de z;

RT(Pz + 1): Tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de x.

As ilustrações dos compostos majoritários foram desenhadas utilizando o software ChemSketch ®.

### 2.3 Atividade citotóxica por ensaio de MTT

As linhagens aderentes melan-a, cedida pelo Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade de São Paulo (USP-SP), B16F10 cedida pela prof<sup>a</sup>. Mirian T. Paes Lopes do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-MG) e 4T1, VERO, SW480 e HEPG-2, cedidas pelo prof. Gustavo Costa Bressan do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV-MG) foram mantidas em frascos de cultura de poliestireno com os meios de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) e RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institut) (Sigma-Aldrich®) completos, ou seja, suplementados com 10 % de SFB (soro fetal bovino - Gibco®) e 1 % de ampicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich®). Os frascos foram incubados em estufa à 37 °C com atmosfera úmida (95 %) e 5 % de CO<sub>2</sub> (condições padrão) até confluência das linhagens.

Após a confluência, as linhagens foram lavadas com PBS (solução fosfato salino), tripsinizadas (Sigma-Aldrich®) e ressuspensas em meio completo para contagem em câmara de Neubauer. No plaqueamento foram semeadas  $1 \times 10^4$  células suspensas em 100 µL de meio completo, em cada poço das placas de 96 poços. Estas foram incubadas em estufa, sob condições padrão, por 24h para aderência.

Os óleos diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO 0,5% - (Sigma-Aldrich®)) foram incorporados em meio completo e cada poço com células recebeu alíquotas de 100 µL da solução nas concentrações de 25, 50, 100, 200 µg mL<sup>-1</sup>. Maiores concentrações de *C. carpinifolia* foram necessárias para o cálculo do IC<sub>50</sub> nas linhagens B16F10 (25, 50, 100, 200, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup>), melan-a (25, 50, 100, 200, 400, 500 e 600 µg mL<sup>-1</sup>), VERO (25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup>), 4T1 (25, 50, 100, 200, 400, 500, 600 e 700 µg mL<sup>-1</sup>). As concentrações de *C. rugosus* também foram ajustadas, mas apenas para a linhagem VERO (50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup>).

Após o tratamento, as células foram novamente incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Posteriormente, os tratamentos foram substituídos por 50 µl de solução de meio contendo 10 % de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) (0.5 mg mL<sup>-1</sup> - Sigma-Aldrich®) e as placas foram incubadas novamente por 3 horas, protegidas da luz. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, que é convertido em um composto roxo insolúvel conhecido como formazan após a clivagem do sal de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Mosmann 1983). Após esse período a solução de MTT foi substituída por 50 µl

de DMSO, por poço, para dissolver os cristais de formazan. A absorbância das placas foi medida utilizando espectrofotômetro (SpectraMax®) a 570 nm. Poços com células tratadas com meio completo contendo DMSO 0,5 % foram utilizadas como controle negativo e poços sem células como branco durante a leitura da absorbância.

A porcentagem de células vivas representou a viabilidade celular e foi calculada utilizando os dados de absorbância (Abs) conforme a equação:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{\text{média Abs tratamento}}{\text{média Abs controle negativo}} \times 100$$

A concentração inibitória de 50 % das células (IC<sub>50</sub>) foi calculada para cada óleo e o índice de seletividade (IS) foi calculado utilizando os resultados encontrados de IC<sub>50</sub> em células cancerosas e células normais, conforme:

$$\text{Índice de seletividade} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ linhagem normal}}{\text{IC}_{50} \text{ linhagem cancerosa}}$$

Através dos valores de Log IC<sub>50</sub> e HillSlope obtidos com a % de células vivas foram calculadas as concentrações inibitórias de 10 % (IC<sub>10</sub>), com 90 % de viabilidade, e de 90 % de inibição das células (IC<sub>90</sub>), com 10 % de viabilidade, seguindo:

$$\text{Log IC}_{10} = \frac{\text{Log IC}_{50} - 1}{\text{HillSlope} * (\text{Log } 90 \left( \frac{100}{90 - 1} \right))}$$

$$\text{Log IC}_{90} = \frac{\text{Log IC}_{50} - 1}{\text{HillSlope} * (\text{Log } 10 \left( \frac{100}{10 - 1} \right))}$$

Também foram calculadas as seletividades dos compostos considerando o IC<sub>10</sub> e o IC<sub>90</sub>.

#### **2.4 Avaliação da morfologia celular por aquisição de imagens após o tratamento com o IC<sub>50</sub> dos óleos essenciais de *C. rugosus* e *C. carpinifolia***

Os óleos que apresentaram Índice de Seletividade superiores a 2 foram selecionados para avaliação da morfologia celular. Foram eles: o óleo essencial de flores e folhas de *C. rugosus* (CR), juntas (IS = 4,72), e apenas de suas folhas (CRF) (IS = 1,60) na linhagem HEPG-2. A escolha do óleo CRF não cumpriu o pré-requisito na seletividade, porém foi escolhido com o objetivo de comparação. Na linhagem SW480 o óleo das flores de *C. carpinifolia* (CC Flores) foi selecionado (IS = 2,71).

Para avaliar a morfologia foram utilizadas imagens obtidas com a câmera de microscópio de luz e fluorescência do tipo Biostation IMq (Nikon®). As células das linhagens HEPG-2 e SW480 foram plaqueadas a uma concentração de  $4 \times 10^4$  células em placas de vidro 35 mm (IBIDI®) e levadas a estufa de cultivo em condições padrão. Após a aderência, as células HEPG-2 foram tratadas com as concentrações de  $IC_{50}$  calculados:  $38,31 \mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo das folhas de CR e  $28,08 \mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo das flores e folhas de CR. As células SW480 receberam tratamento com  $80,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo de flores de CC e as células do controle, de ambos experimentos, foram tratadas com 0,5 % de DMSO. As placas foram novamente levadas a estufa de cultivo e mantidas até a aquisição das imagens, com exceção da placa de HEPG-2 tratada com o  $IC_{50}$  do óleo de flores e folhas de CR. Ela foi mantida dentro do microscópio do tipo Biostation IMq (Nikon®) com temperatura controlada de  $37^\circ\text{C}$ , 5 % de injeção de  $\text{CO}_2$  e umidade de 95 %. Durante 24 horas foram adquiridas 73 imagens na objetiva de 20x em 11 pontos diferentes, escolhidos de forma aleatória. Os 4 pontos que apresentavam imagens menos distorcidas ao final das 24 horas foram agrupados em timelapse. Decorridas as 24 horas de tratamento de todas as placas, estas foram observadas e imagens foram obtidas, após varredura aleatória das placas, nas objetivas de 20x, 40x e 80x com tempos de exposição entre 5 e 75 milissegundos, dependendo da objetiva. O ganho e a intensidade de luz branca variaram de acordo com o campo observado.

## **2.5 Avaliação do tipo de morte celular e do ciclo celular por Citometria de Fluxo**

Também foram selecionadas para a avaliação do tipo de morte celular, as células tratadas com os óleos que apresentaram seletividade maiores ou próximas a 2, como indicado no tópico acima, porém as concentrações utilizadas foram os valores calculados de  $IC_{90}$ .

Em placas de 6 poços foram semeadas cerca de  $1 \times 10^6$  células / poço das linhagens HEPG-2 e SW480. Após a aderência, as células foram tratadas com os valores de  $IC_{90}$  correspondente a cada tratamento, sendo eles,  $IC_{90}$  CR flores e folhas:  $69,63 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $IC_{90}$  CR folhas:  $100,73 \mu\text{g mL}^{-1}$  em HEPG-2 e  $IC_{90}$  do óleo das flores de CC:  $147,50 \mu\text{g mL}^{-1}$  em SW480. As concentrações de  $IC_{90}$  foram utilizadas com o objetivo de garantir que um número alto de células estaria em processo de morte celular. Decorridas 24 horas de tratamento as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O tempo de 24 horas foi empregado com o objetivo de visualizar as células no início do processo. Metade das células foram utilizadas no protocolo para citometria de fluxo visando avaliar o tipo de morte celular e o restante na avaliação do ciclo celular.

Para avaliação da morte celular, as células foram ressuspensas em PBS (1 mL), centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão Hank's (1 mL). Novamente foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado, e ressuspensas em 200  $\mu$ L de Hank's com 5  $\mu$ L de Anexina V- FITC (ImunoTools®, Friesoythe, NI, Alemanha). Após isso, o material foi transferido para tubos de microcentrífuga (Eppendorf®) e levados a refrigeração até o momento da análise no Citômetro de fluxo BD FACS Verse®. Antes da contagem e análise, foi adicionado 5  $\mu$ L de solução de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich®) na concentração estoque de 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Foram analisados 10000 eventos por amostra.

Para avaliação do ciclo celular, as células foram ressuspensas em álcool etílico 70 % (1 mL) e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado mantendo-se aproximadamente 50  $\mu$ L de álcool com as células. Essas foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de solução contendo PBS, RNase A (20mg mL<sup>-1</sup> - Invitrogen®) e iodeto de propídeo (10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> - Sigma-Aldrich®) e incubadas por 1 hora antes da contagem e análise no Citômetro de fluxo.

## 2.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ordinary one-way. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett à 5 % de significância utilizando o programa GraphPad Prism®. O IC<sub>50</sub> foi calculado por meio de uma regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas), utilizando os programas GraphPad Prism® 5.0 e Microsoft Office Excel 2013®. Utilizando os valores de IC<sub>50</sub> e HillSlope das regressões não lineares também foi possível calcular os valores de IC<sub>10</sub> e IC<sub>90</sub>. Foram representados nos gráficos as médias de 3 experimentos independentes com seus respectivos desvios padrões.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Coleta das plantas e extração dos óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais de *C. rugosus* (CR) e *C. carpinifolia* (CC) foi realizada a partir de folhas e flores, (CR Folhas e flores e CR folhas e CC Flores e CC Folhas), secas a temperatura ambiente. Os rendimentos calculados na massa de matéria seca foram de 0,51; 1,27 e 0,51% (v/m) para CR Folhas e flores, CC Flores e CC Folhas, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Rendimentos dos óleos essenciais de *Hyptis* coletadas no Cerrado Mineiro

Material vegetal	Volume de óleo obtido (mL/100g)	Umidade da amostra (%)	Rendimento (%)
CR	0,40	21,50	0,51
CC Flores	1,10	13,62	1,27
CC Folhas	0,45	11,47	0,51

CR: Folhas e flores de *C. rugosus*; CC Flores: Flores de *C. carpinifolia* e CC Folhas: Folhas de *C. carpinifolia*.

Fonte: A autora.

### 3.2 Composição química dos óleos essenciais de *C. rugosus* e *C. carpinifolia*

Levando em consideração os tempos de retenção (RT) e comparando os espectros de massa com a biblioteca de espectros de massa Wiley 6.0 (EUA) e literatura (Adams, 2007), foi possível identificar as substâncias presentes nos óleos essenciais. A quantificação dos constituintes foi realizada a partir dos perfis do cromatograma utilizando áreas relativas dos picos (%). De um total de 34 componentes detectados foram identificados 25 componentes para o óleo de folhas e flores de *C. rugosus*, sendo os principais  $\beta$ -cariofileno (22,84 %), Germacreno D (19,97 %),  $\delta$ -Acoradieno (11,71 %) Espatuleno (8,30 %) e Tau-cadinol (5,30 %) representando 68,12 % de um total de 91,94 % de componentes identificados (Tabela 2 e Figura 4). No óleo essencial das folhas de *C. rugosus* foram detectados 40 componentes e identificados 29 (Tabela 2 e Figura 4). Desses, os compostos com maiores concentrações foram: Germacreno D (16,11 %),  $\beta$ -cariofileno (12,51 %), Espatuleno (12,16 %),  $\delta$ -Acoradieno (11,98 %) e Óxido de cariofileno (6,49 %). O pico número 40 também alcançou mais de 5% do total de substâncias (7,88 %), porém não foi possível sua identificação. De um total de 84,19 % de componentes identificados, os compostos majoritários do óleo das folhas de CR somaram 59,25 %.

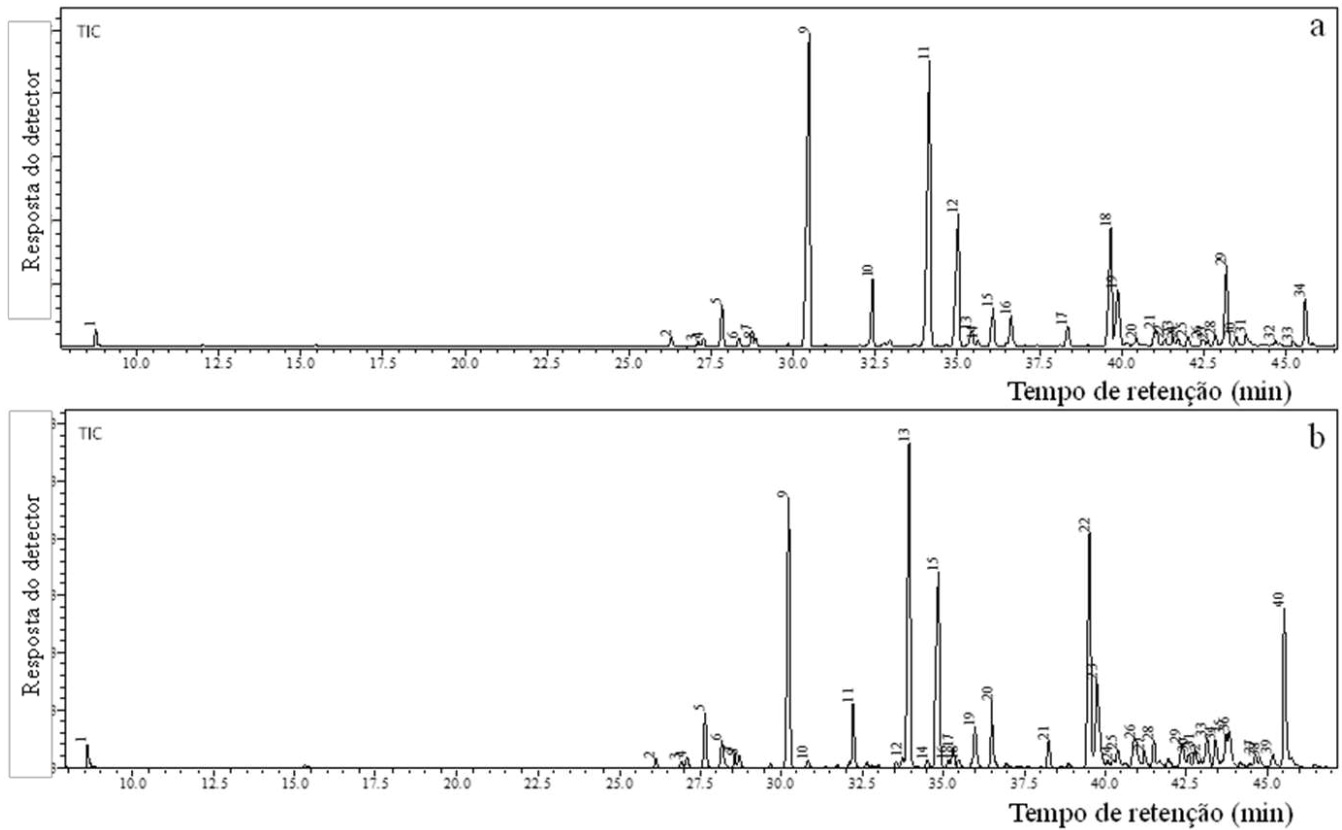
A relação das substâncias identificadas nos óleos essenciais, suas quantidades relativas e os índices aritméticos são apresentados nas Tabela 2 e Tabela 3. Destacados em negrito estão os compostos com concentração maiores que 5 %.

Tabela 2 - Composição química dos óleos essenciais de folhas e flores de *Cyanocephalus rugosus*

Picos	RTx Folha e flor	RTx Folha	IA	IA teóri co	Componente	IS %	[ ] % Folha e flor	[ ] % Folha
1	8,769	8,602	1026	1024	Limoneno	96	0,63	0,72
2	26,301	26,137	1345	1348	$\alpha$ - Cubebeno	94	0,50	0,32
3	27,107	26,925	1358	1369	Cyclosativeno	93	0,26	0,11
4	27,264	27,089	1361	1371	Longiciclono	89	0,50	0,34
5	27,84	27,665	1370	1374	Copaeno < $\alpha$ ->	96	2,29	2,28
6	28,34	28,172	1379	1387	Bourboneno < $\beta$ ->	94	0,46	1,04
7	28,737	28,579	1385	1387	Cubebeno < $\beta$ ->	95	0,89	0,57
8	28,87	28,717	1387	1389	Elemeno < $\beta$ ->	91	0,50	0,43
<b>9</b>	<b>30,488</b>	<b>30,238</b>	<b>1414</b>	<b>1417</b>	<b><math>\beta</math>-cariofileno</b>	<b>96</b>	<b>22,84</b>	<b>12,51</b>
10		30,84	1424	1430	$\beta$ -Copaeno	85		0,19
10 e 11	32,408	32,234	1447	1452	$\alpha$ -cariofileno	95	3,72	2,66
12		33,757	1473	1483	$\alpha$ - Amorfenno	88		0,28
<b>11 e 13</b>	<b>34,151</b>	<b>33,946</b>	<b>1476</b>	<b>1480</b>	<b>Germacreno D</b>	<b>95</b>	<b>19,97</b>	<b>16,11</b>
<b>12 e 15</b>	<b>35,043</b>	<b>34,859</b>	<b>1491</b>	<b>1498</b>	<b><math>\delta</math>-Acoradieno</b>	<b>87</b>	<b>11,71</b>	<b>11,98</b>
16		35,167	1497	1500	$\alpha$ - Muroleno	85		0,22
13 e 17	35,454	35,309	1498	1508	Germacreno A	93	0,91	0,80
15 e 19	36,102	35,984	1509	1502	$\gamma$ - Patchouleno	84	3,35	1,78
16 e 20	36,643	36,51	1519	1513	$\delta$ -Cadineno	93	1,66	3,23
17 e 21	38,375	38,252	1549	1545	eudesma-3,7(11)- dieno	88	1,36	1,12
<b>18 e 22</b>	<b>39,67</b>	<b>39,531</b>	<b>1572</b>	<b>1577</b>	<b>Espatuleno</b>	<b>94</b>	<b>8,30</b>	<b>12,16</b>
<b>19 e 23</b>	<b>39,892</b>	<b>39,753</b>	<b>1576</b>	<b>1582</b>	<b>Óxido de cariofileno</b>	<b>92</b>	<b>4,72</b>	<b>6,49</b>
24		40,25	1585	1592	Viridiflorol	88		0,24
21 e 26	41,05	40,941	1596	1590	Globulol	90	1,47	2,23
22 e 27	41,321	41,216	1601	1608	Humulene epoxide II	89	0,46	0,87
24	41,724	42,378	1608	1618	1,10-di-epi- Cubenol	89	0,49	
26 e 29	42,485	42,779	1622	1627	1-epi-Cubenol	82	0,52	1,33
28 e 32	42,86	43,158	1629	1639	Aloaromadendren o epoxido	83	0,63	0,86
<b>29 e 31</b>	<b>43,202</b>	<b>43,729</b>	<b>1635</b>	<b>1638</b>	<b>tau-cadinol</b>	<b>94</b>	<b>5,30</b>	1,67
30 e 33	43,507	43,839	1641	1644	$\delta$ -Cadinol	92	0,50	1,33
34		43,426	1643	1640	tau-Murolol	88		0,32
					TOTAL:		91,94 %	84,19 %

RT: Tempo de retenção; IA: índice aritmético; IS: Índice de similaridade; [ ] Concentração. Os picos se referem a figura 4. Destacados em negrito estão os compostos com concentração maiores que 5%. Fonte: A autora.

Figura 4 - Cromatograma do óleo essencial das folhas e flores (a) e das folhas (b) de *C. rugosus*



Fonte: A autora.

No óleo essencial obtido das flores de *C. carpinifolia* foram identificados 32 componentes de 34 detectados (Figura 5a), correspondentes a 99,6 % da mistura. Como observado na Tabela 3, os componentes mais representativos somaram 68,72 % do óleo e foram  $\alpha$ -Tujona (46,05 %), Espatuleno (6,72 %), Sabineno (6,06 %), Isocarofileno (5,09 %) e  $\alpha$ -Copaeno (4,80 %). A composição química do óleo essencial das folhas de *C. carpinifolia* também estão apresentadas nas Tabela 3. Foram identificados 28 componentes, de 34 detectados (Figura 5b), correspondentes a 96,3 % do total do óleo em uma mistura complexa. Os compostos majoritários foram  $\alpha$ -Tujona (43,13 %), Sabineno (8,87 %), Espatuleno (7,92 %), Óxido de cariofileno (5,41 %) e  $\beta$ -Tujona (5,14 %), representando 70,46 % do total identificado.

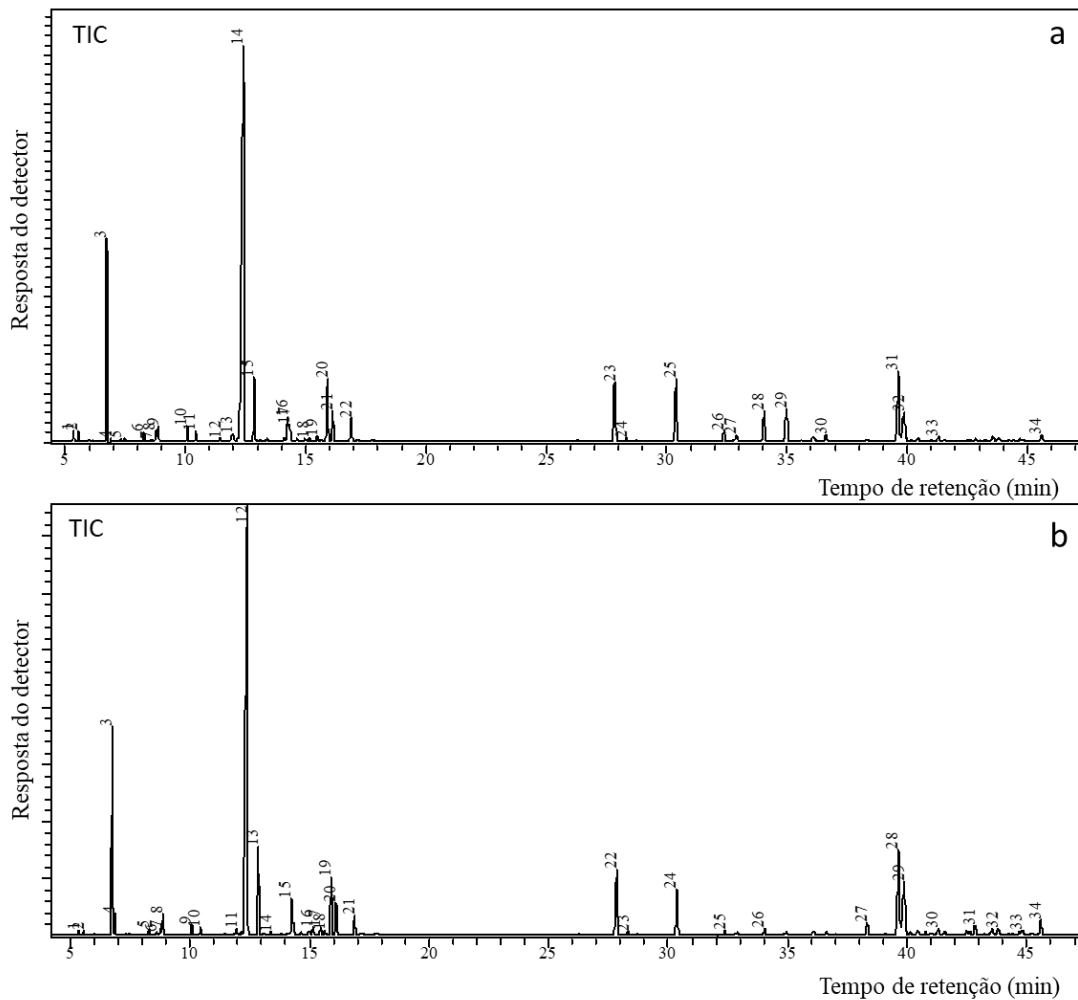
Tabela 3 - Composição química dos óleos essenciais de flores e folhas de *Cantinoa carpinifolia*

Picos	RTx Flor	RTx Folha	IA	IA teórico	Componente	IS %	[ ] % Flor	[ ] % Folha
1 e 1	5,349	5,348	924	924	$\alpha$ -tujeno	94	0,44	0,16
2 e 2	5,552	5,551	931	932	$\alpha$ -pineno	97	0,42	0,15
<b>3 e 3</b>	<b>6,736</b>	<b>6,744</b>	<b>970</b>	<b>969</b>	<b>Sabineno</b>	<b>95</b>	<b>6,06</b>	<b>8,87</b>
4		6,858	974	974	$\beta$ -Pinene	97		0,89
5	7,316		989	988	Mirceno	92	0,15	
6 e 5	8,283	8,283	1015	1014	$\alpha$ -Terpineno	93	0,44	0,26
7 e 6	8,600	8,605	1022	1020	p-Cimeno	96	0,13	0,16
8 e 7	8,780	8,777	1026	1024	Limoneno	90	0,59	0,40
9 e 8	8,860	8,858	1028	1026	1,8-Cineol	96	0,78	1,07
10 e 9	10,070	10,069	1055	1054	$\gamma$ -Terpineno	97	0,87	0,59
11 e 10	10,431	10,430	1063	1065	cis-Sabineno hidrato	92	0,68	0,43
12	11,456		1086	1086	Terpinoleno	94	0,17	
13 e 11	11,972	11,951	1097	1098	trans-Sabineno hidrato	90	0,75	0,47
<b>14 e 13</b>	<b>12,419</b>	<b>12,400</b>	<b>1106</b>	<b>1101</b>	<b><math>\alpha</math>-Tujona</b>	<b>97</b>	<b>46,05</b>	<b>43,14</b>
15 e 14	12,858	<b>12,857</b>	<b>1114</b>	<b>1112</b>	<b><math>\beta</math>-Tujona</b>	<b>95</b>	3,87	<b>5,14</b>
16 e 15	14,252	14,250	1139	1141	Canfora	97	1,63	2,78
17	14,327		1141	1137	cis-Verbenol	93	0,93	
18 e 16	15,148	15,144	1156	1158	trans- Pinocanfona	96	0,18	0,41
19 e 17	15,475	15,469	1162	1164	3-Tujanol	92	0,31	0,49
18		15,625	1164	1165	Lavandulol	92		0,36
20 e 19	15,911	15,904	1170	1172	cis- Pinocanfona	96	4,45	3,91
21 e 20	16,118	16,113	1173	1174	Terpinen-4-ol	96	2,07	2,06
22 e 21	16,888	16,884	1187	1186	$\alpha$ -Terpineol	96	1,63	1,29
23 e 22	27,844	27,841	1370	1374	$\alpha$ -Copaeno	96	4,80	4,94
24 e 23	28,333	28,331	1378	1387	$\beta$ -Bourboneno	93	0,20	0,24
<b>25 e 24</b>	<b>30,392</b>	30,376	<b>1413</b>	<b>1408</b>	<b>Isocariofileno</b>	<b>96</b>	<b>5,09</b>	3,47
26 e 25	32,381	32,374	1446	1452	$\alpha$ -Humuleno	97	0,81	0,28
27	32,901		1455	1454	(E)- $\beta$ - Farneseno	90	0,26	
28 e 26	34,048	34,036	1474	1480	Germacrene D	94	2,47	0,47
29	34,983		1490	1500	Germacrene B	92	2,53	
30	36,624		1518	1522	Cadinene < $\delta$ ->	93	0,47	
<b>31 e 28</b>	<b>39,640</b>	<b>39,650</b>	<b>1571</b>	<b>1577</b>	<b>Espatuleno</b>	<b>94</b>	<b>6,722</b>	<b>7,92</b>

Picos	RTx Flor	RTx Folha	IA	IA teórico	Componente	IS %	[ ] % Flor	[ ] % Folha
32 e <b>29</b>	39,862	<b>39,870</b>	<b>1575</b>	<b>1582</b>	<b>Óxido de cariofileno</b>	<b>95</b>	3,17	<b>5,41</b>
33 e 30	41,310	41,309	1601	1608	Humuleno epoxido II	89	0,34	0,40
						<b>TOTAL:</b>	<b>99,6%</b>	<b>96,3%</b>

RT: Tempo de retenção; IA: índice aritmético; IS: Índice de similaridade; [ ] Concentração. Os picos se referem as figuras 5a e 5b, respectivamente. Destacados em negrito estão os compostos com concentração maiores que 5%. Fonte: A autora.

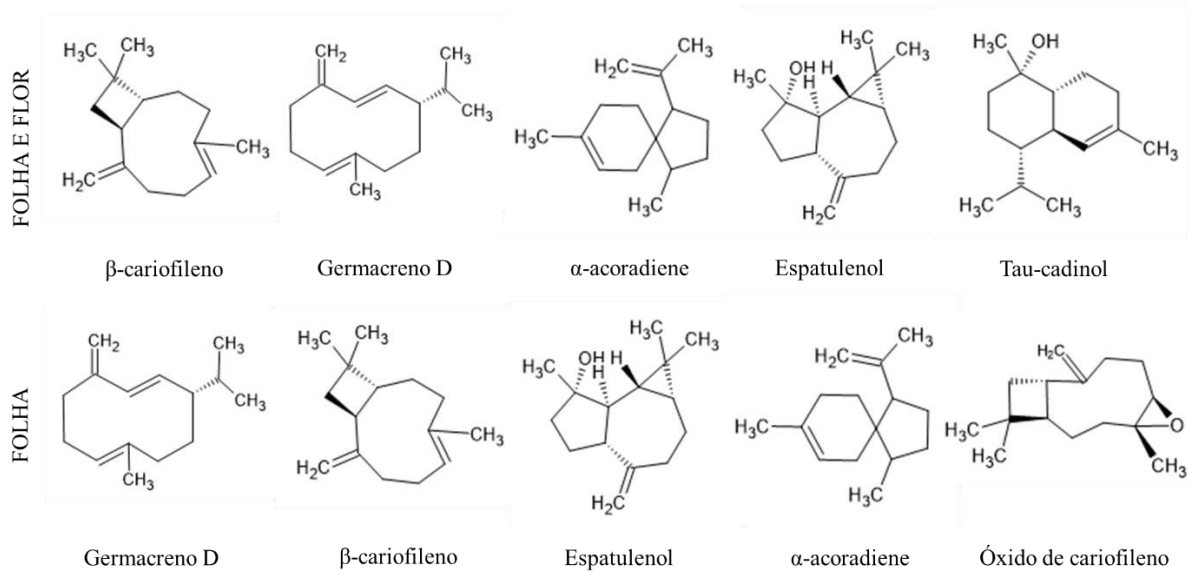
Figura 5 - Cromatograma do óleo essencial das flores (a) e folhas (b) de *C. carpinifolia*



Fonte: A autora.

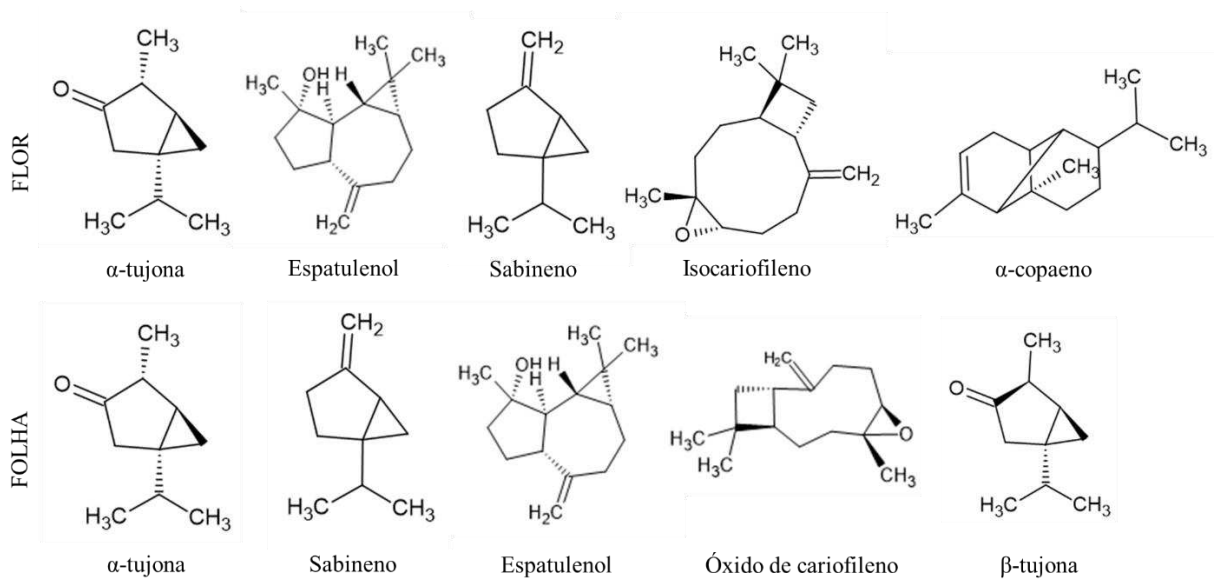
Considerando as substâncias majoritárias, a espécie *C. rugosus* é rica em sesquiterpenos (C15), como observamos na figura 6, enquanto *C. carpinifolia* é rica em monoterpenos (C10), como observamos na figura 7.

Figura 6 - Estruturas químicas dos componentes principais do óleo essencial de folhas e flores de *Cyanocephalus rugosus*



Fonte: A autora.

Figura 7: Estruturas químicas dos componentes principais dos óleos essenciais das flores e folhas de *Cantinoa carpinifolia*



Fonte: A autora.

### 3.3 Atividade citotóxica por ensaio de MTT

A citotoxicidade dos óleos foi medida utilizando o ensaio colorimétrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5difeniltetratozól] para determinar a viabilidade celular através da atividade mitocondrial. O óleo essencial de folhas e flores de *C. rugosus* exibiu citotoxicidade

em todas as linhagens testadas, murinas e humanas (Tabelas 4 e 5), porém apenas nas células humanas foram identificadas seletividade. Com isso, o óleo extraído a partir das folhas de CR foi testado apenas nas células de linhagens humanas.

Na tabela 4 estão resumidos os valores de IC<sub>50</sub> e os índices de seletividade calculados para os óleos de Lamiaceae coletadas no Cerrado nas células murinas. Como podemos observar, apenas para o óleo essencial de *C. rugosus*, a relação melan-a/4T1 resultou em um valor acima de 1 (1,11). Curiosamente as seletividades para o melanoma (B16F10) e para o câncer de mama (4T1) nas flores apresentaram valores similares (0,27 – B16F10 e 0,26 – 4T1), o que também ocorreu com o óleo das folhas (0,43 – B16F10 e 0,48 – 4T1).

Tabela 4 – Concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) (µg mL<sup>-1</sup>) das células murinas e índice de seletividade (IS) dos óleos essenciais de Lamiaceae do Cerrado

Óleos essenciais		melan-a	B16F10	4T1	IS (MELAN-A/ B16F10)	IS (MELAN-A/ 4T1)
CR Folhas e flores	IC <sub>50</sub>	49,89	76,86	44,85	0,64	1,11
	Log IC <sub>50</sub>	1,69	1,88	1,65		
	R <sup>2</sup>	0,85	0,91	0,85		
	HillSlope	-1,75	-3,84	-7,23		
CC Flores	IC <sub>50</sub>	54,07	197,8	206,3	0,27	0,26
	Log IC <sub>50</sub>	1,73	2,29	2,31		
	R <sup>2</sup>	0,89	0,85	0,85		
	HillSlope	-0,89	-0,70	-2,57		
CC Folhas	IC <sub>50</sub>	85,72	194,9	178,1	0,43	0,48
	Log IC <sub>50</sub>	1,93	2,29	2,25		
	R <sup>2</sup>	0,94	0,74	0,86		
	HillSlope	-1,20	-0,837	-2,51		

CR: *Cyanocephalus rugosus*; CC: *Cantinoa carpinifolia*; melan-a: célula normal murina; B16F10: célula de melanoma murina; 4T1: célula de câncer de mama murino. Fonte: A autora.

Os óleos essenciais de *C. rugosus* e *C. carpinifolia* exibiram seletividades mais elevadas nas linhagens humanas, comparado as linhagens murinas. Na tabela 5 estão resumidos os valores de IC<sub>50</sub> e os índices de seletividade calculados para os óleos de Lamiaceae nas células de origens humana e de primata não humano. Para o câncer colorretal humano (SW480) o óleo de flores e folhas de *C. rugosus* apresentou uma seletividade próxima a 2 (1,89), enquanto o óleo das flores de *C. carpinifolia* exibiu a maior seletividade (2,71), entre os óleos testados. O óleo das folhas de *C. carpinifolia* apresentou seletividade de 1,28, sendo a menor seletividade para SW480. Quando observamos a linhagem de câncer de fígado humano (HEPG-2), a melhor seletividade foi com o óleo de flores e folhas de *C. rugosus* que alcançou 4,72. Curiosamente, o segundo maior valor não foi obtido do óleo das suas folhas, mas sim do óleo das flores de *C. carpinifolia* com 1,97. O óleo das folhas de CR exibiu seletividade de 1,60 para a linhagem HEPG-2.

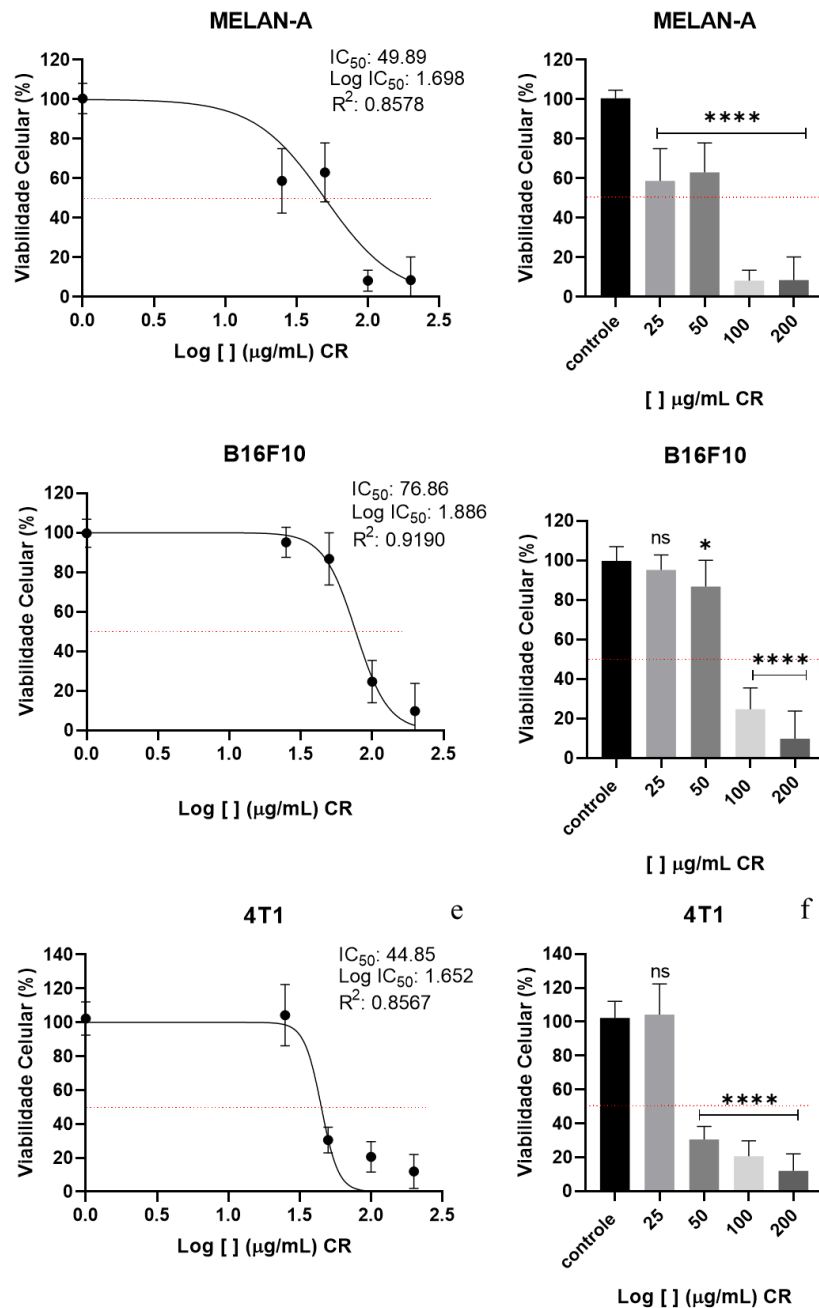
Tabela 5– Concentração inibitória de 50 % (IC<sub>50</sub>) (µg mL<sup>-1</sup>) das células humanas e índice de seletividade (IS) dos óleos essenciais de Lamiaceae do Cerrado

Óleos essenciais		VERO	SW480	HEPG-2	IS (VERO/ SW480)	IS (VERO/ HEPG-2)
CR Folhas e flores	IC <sub>50</sub>	132,7	70,18	28,08		
	Log IC <sub>50</sub>	2,12	1,84	1,44		
	R <sup>2</sup>	0,89	0,85	0,94	1,89	4,72
	HillSlope	-2,66	-2,56	-2,41		
CR Folhas	IC <sub>50</sub>	61,36	42,27	38,31		
	Log IC <sub>50</sub>	1,78	1,62	1,58		
	R <sup>2</sup>	0,93	0,91	0,90	1,45	1,60
	HillSlope	-3,87	-2,29	-2,27		
CC Flores	IC <sub>50</sub>	218,9	80,6	110,6		
	Log IC <sub>50</sub>	2,35	1,90	2,04		
	R <sup>2</sup>	0,84	0,85	0,91	2,71	1,97
	HillSlope	-2,01	-3,63	-2,71		
CC Folhas	IC <sub>50</sub>	151,6	117,6	147		
	Log IC <sub>50</sub>	2,18	2,07	2,16		
	R <sup>2</sup>	0,91	0,75	0,77	1,28	1,03
	HillSlope	-2,49	-1,55	-2,88		

CR: *Cyanocephalus rugosus*; CC: *Cantinoa carpinifolia*; VERO: Epitélio de rim normal de macaco verde africano; SW480: Câncer colorretal humano; HEPG-2: Câncer de fígado humano. Fonte: A autora.

Para as linhagens murinas, o maior efeito citotóxico do óleo de flores e folhas de CR foi observado no câncer de mama (4T1), aonde as 3 maiores concentrações (200, 100 e 50 µg/mL) exibiram reduções maiores que 50% na viabilidade, comparado ao controle. Com isso, o IC<sub>50</sub> calculado para 4T1 foi de 44,85 µg mL<sup>-1</sup> (Figuras 8e e 8f). A segunda linhagem mais sensível ao tratamento com *C. rugosus* foram os melanócitos normais (melan-a), aonde as concentrações de 200 e 100 µg mL<sup>-1</sup> reduziram em 91,79 e 91,49 % da viabilidade (Figuras 8a e 8b). Com reduções tão elevadas, o IC<sub>50</sub> calculado para melan-a foi de 49,89 µg mL<sup>-1</sup>, próximo ao encontrado para 4T1. Comparado as linhagens murinas, o menor efeito citotóxico do óleo essencial de CR foi observado nas células de melanoma (B16F10) (Figuras 8c e 8d). As concentrações de 200 e 100 µg mL<sup>-1</sup> foram responsáveis por reduções de 90,24 e 75,27 % na viabilidade celular, respectivamente, assim, o IC<sub>50</sub> calculado foi de 76,86 µg mL<sup>-1</sup>.

Figura 8 - Viabilidade das células melan-a (a; b), B16F10 (c; d) e 4T1 (e; f) em função da concentração do óleo essencial de folhas e flores de *Cyanocephalus rugosus* após 48h de tratamento

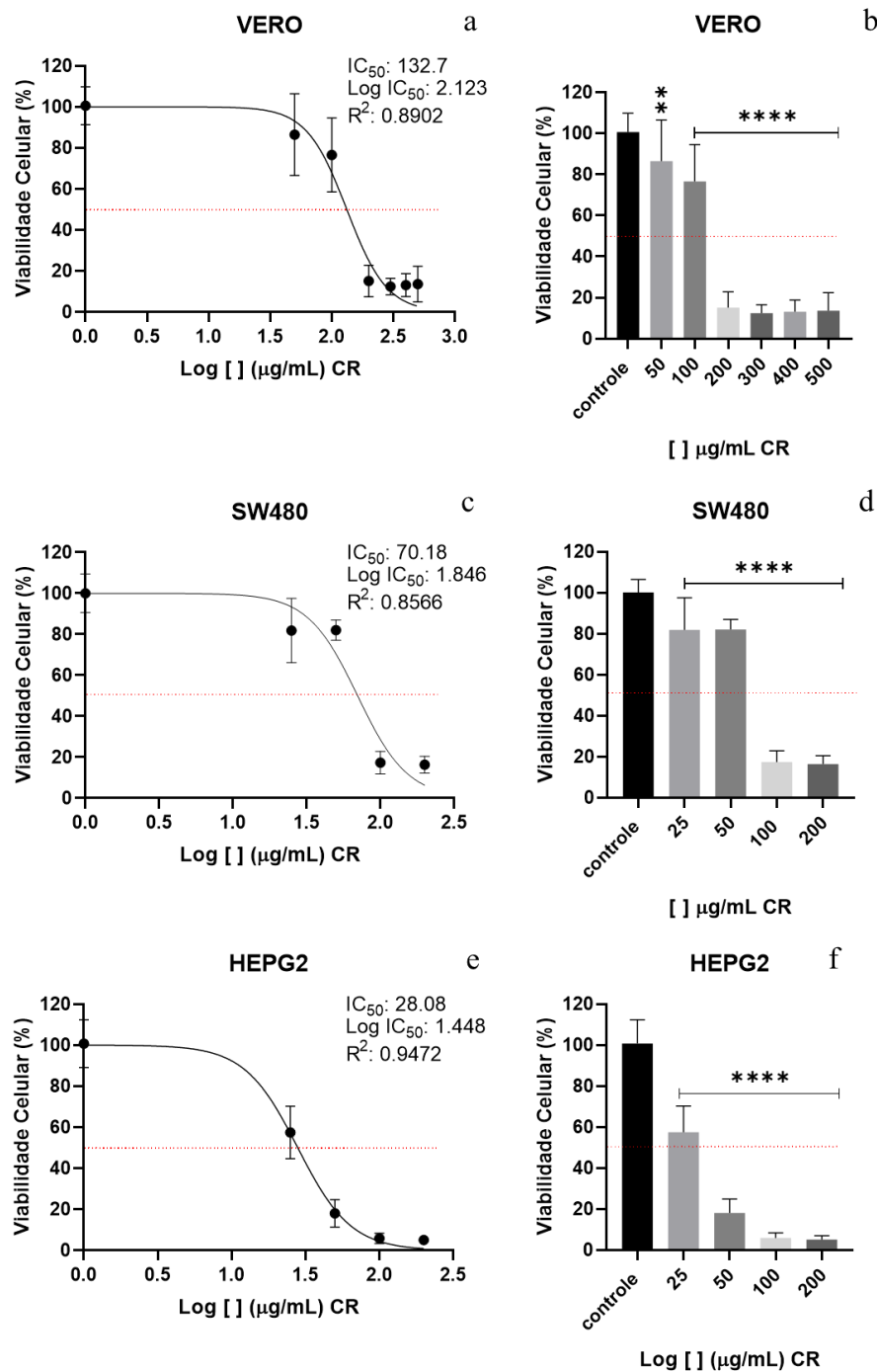


Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 8a, 8c e 8e: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 8b, 8d e 8f: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,70$ ), \* ( $P = 0,04$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

Nas linhagens humana e de primata, o câncer de fígado (HEPG-2) e o câncer colorretal (SW480) foram mais sensíveis aos dois óleos de *C. rugosus*, comparado as células epiteliais normais (VERO) (Figura 9 e Figura 10). De fato, nos experimentos com a concentração inicial de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo de flores e folhas de CR não foi possível calcular o IC<sub>50</sub> para a linhagem VERO, sendo necessário a ampliação das concentrações para  $300$ ,  $400$  e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figuras

9a e 9b). Com isso, o  $IC_{50}$  foi de  $132,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  para essas células. Na linhagem HEPG-2 o óleo de flores e folhas de CR exibiu maior citotoxicidade, com o  $IC_{50}$  chegando a  $28,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e melhor seletividade ( $IS = 4,72$ ). Nas células SW480, o  $IC_{50}$  foi de  $70,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com as concentrações de 200 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  reduzindo mais de 80 % da viabilidade (Figuras 9c e 9d), porém a seletividade se manteve abaixo de 2 (1,89).

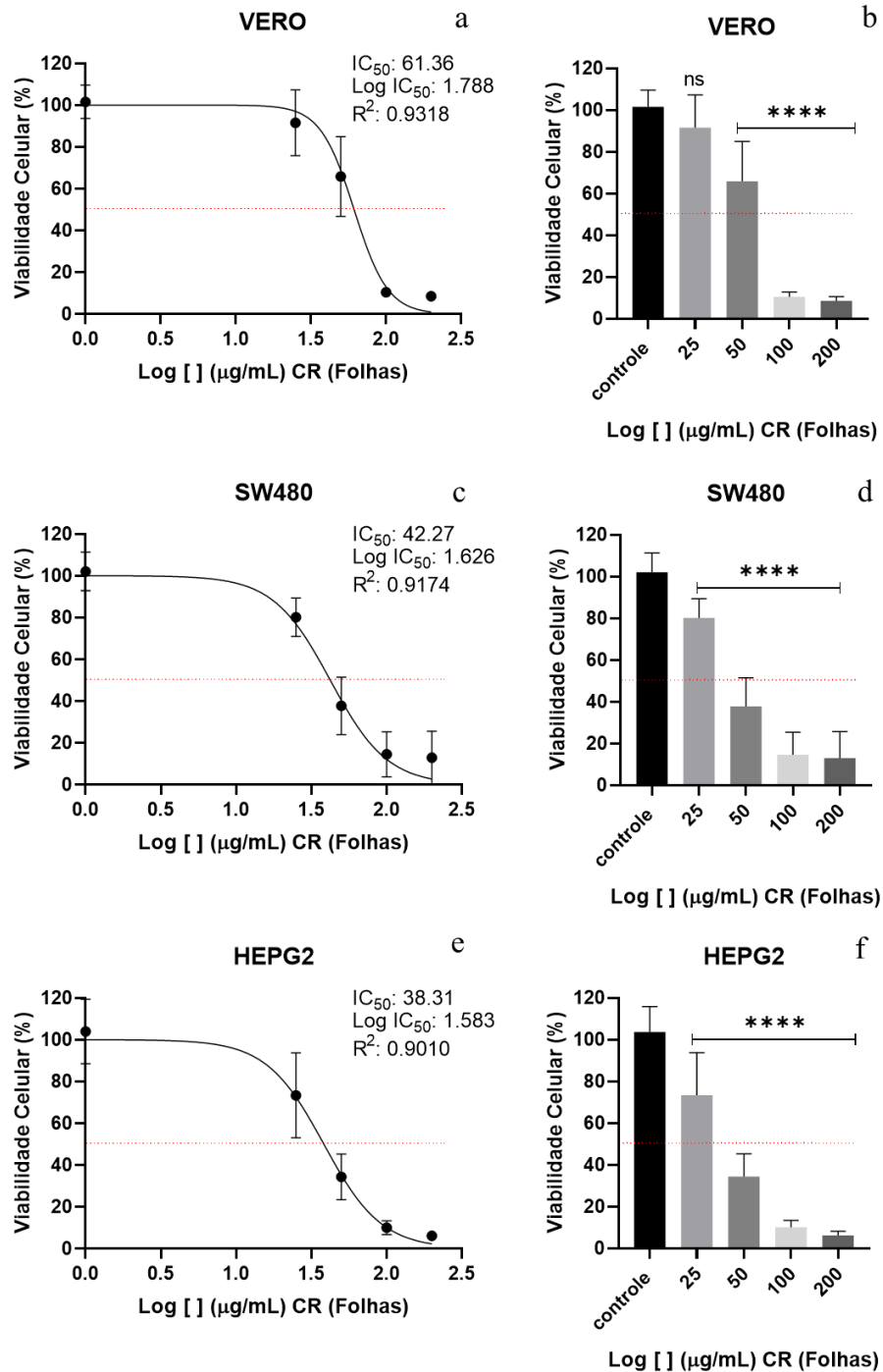
Figura 9 - Viabilidade das células VERO (a; b), SW480 (c; d) e HEPG-2 (e; f) em função da concentração do óleo essencial de folhas e flores de *Cyanocephalus rugosus* após 48h de tratamento



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 9a, 9c e 9e: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 9b, 9d e 9f: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: \*\* (P = 0,006) e \*\*\*\* (P < 0,0001). Fonte: A autora.

O óleo obtido apenas com as folhas de CR apresentou elevada citotoxicidade contra todas as linhagens testadas (VERO, SW480 e HEPG-2) (Figura 10). Como os valores de IC<sub>50</sub> calculados para as linhagens cancerosas ficaram próximos ao valor calculado para a linhagem normal, o óleo de folhas de CR não exibiu seletividade. Para SW480 o IS foi de 1,45 e para HEPG-2 foi de 1,60.

Figura 10 - Viabilidade das células VERO (a; b), SW480 (c; d) e HEPG-2 (e; f) em função da concentração do óleo essencial das folhas de *Cyanocephalus rugosus* após 48h de tratamento

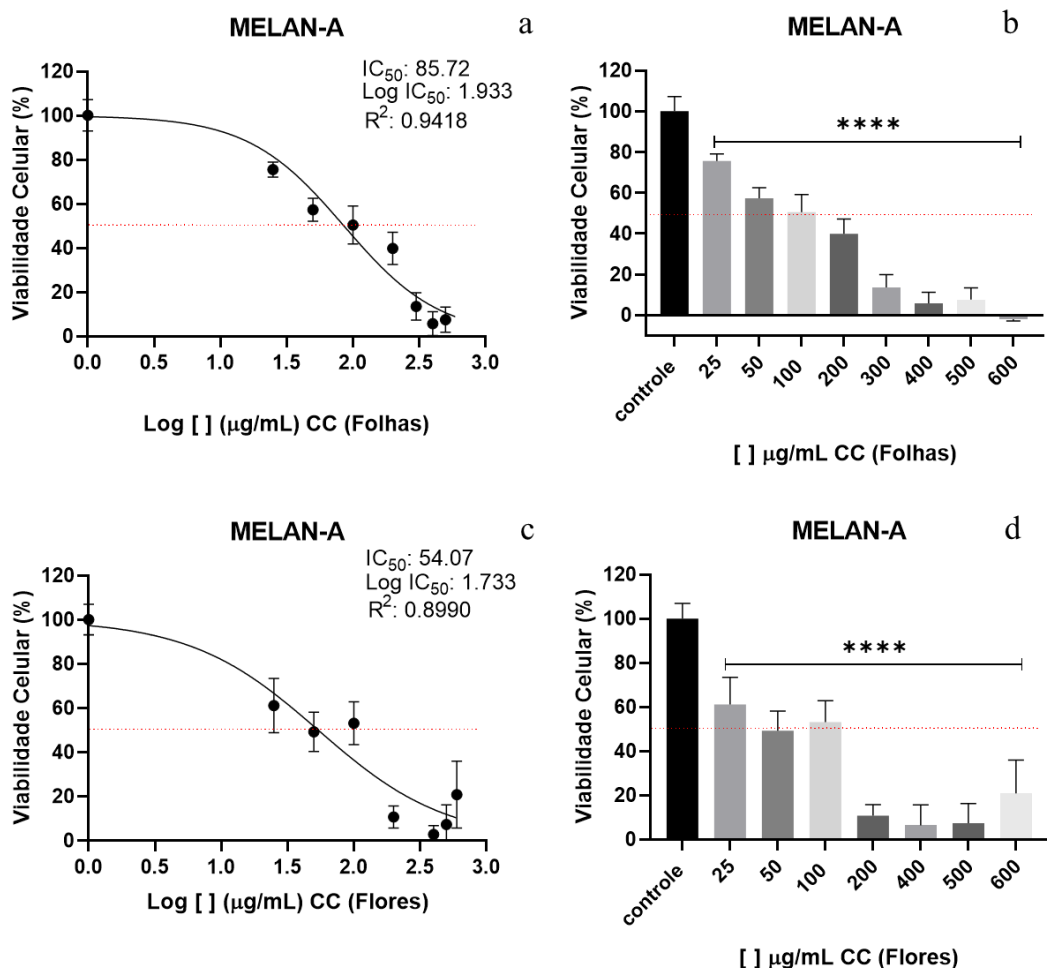


Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 10a, 10c e 10e: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 10b, 10d e 10f: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,09$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

A citotoxicidade dos óleos de *C. carpinifolia* foram maiores nos melanócitos normais murinos (melan-a) (Figura 11), comparado às linhagens murinas de melanoma (B16F10) (Figura 12) e câncer de mama (4T1) (Figura 13). De forma que os valores de  $IC_{50}$  foram menores na linhagem normal. Os óleos essenciais das folhas e flores de *C. carpinifolia*

apresentaram redução na viabilidade celular de melan-a em todas as concentrações ensaiadas (25 a 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 11). Os maiores efeitos foram observados nas flores onde o  $\text{IC}_{50}$  calculado foi de 54,07  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figuras 11c e 11d) contra 85,72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nas folhas (Figuras 11a e 11b). Embora o efeito tóxico tenha sido maior na concentração de 600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo das folhas, com viabilidade celular considerada negativa, o  $\text{IC}_{50}$  do óleo das flores foi menor em função da redução na viabilidade observada na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Enquanto foram observadas reduções de 89,26 %, quando o óleo das flores foi utilizado na mesma concentração do óleo das folhas, a redução ficou em 60,23 %.

Figura 11 – Viabilidade das células melan-a em função da concentração do óleo essencial das folhas (a; b) e das flores (c; d) de *Cantinoa carpinifolia* após 48h

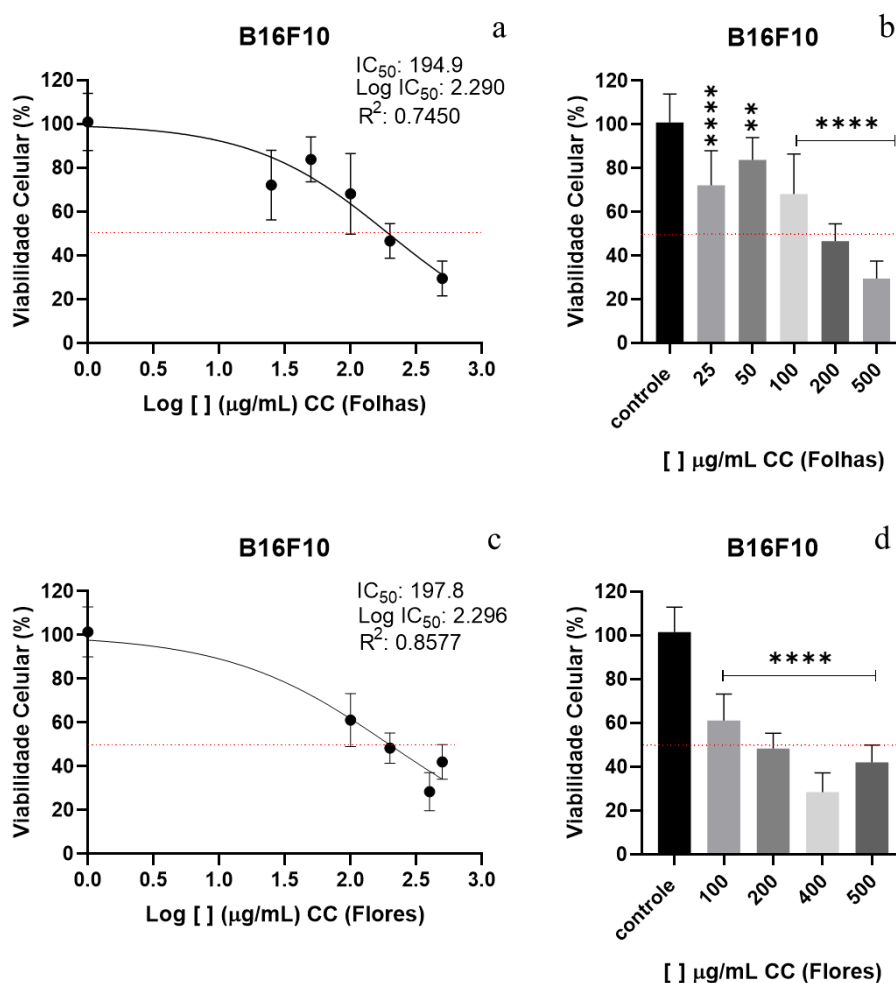


Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 11a, 11c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 11b, 11d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: \*\*\*\* (P < 0,0001). Fonte: A autora.

Na linhagem de melanoma murino (B16F10), a viabilidade celular foi afetada de forma similar em ambos os óleos de *C. carpinifolia* (Figura 12). No óleo das folhas as concentrações de 500 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram responsáveis por reduções de 70,71 % e 53,82 %, respectivamente,

sendo as únicas exibindo viabilidade abaixo de 50 % (Figuras 12a e 12b). O  $IC_{50}$  para o óleo das folhas foi de  $194,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto para o óleo das flores foi de  $197,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As concentrações de 500, 400 e  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  das flores exibiram reduções na viabilidade de B16F10 de 58,59 %; 71,94 % e 52,31 %, respectivamente (Figuras 12c e 12d). Com isso, os valores de seletividade contra o melanoma murino foram 0,27 para o óleo das flores e 0,43 para o óleo das folhas.

Figura 12 - Viabilidade das células B16F10 em função da concentração do óleo essencial das folhas (a; b) e das flores (c; d) de *Cantinoa carpinifolia* após 48h

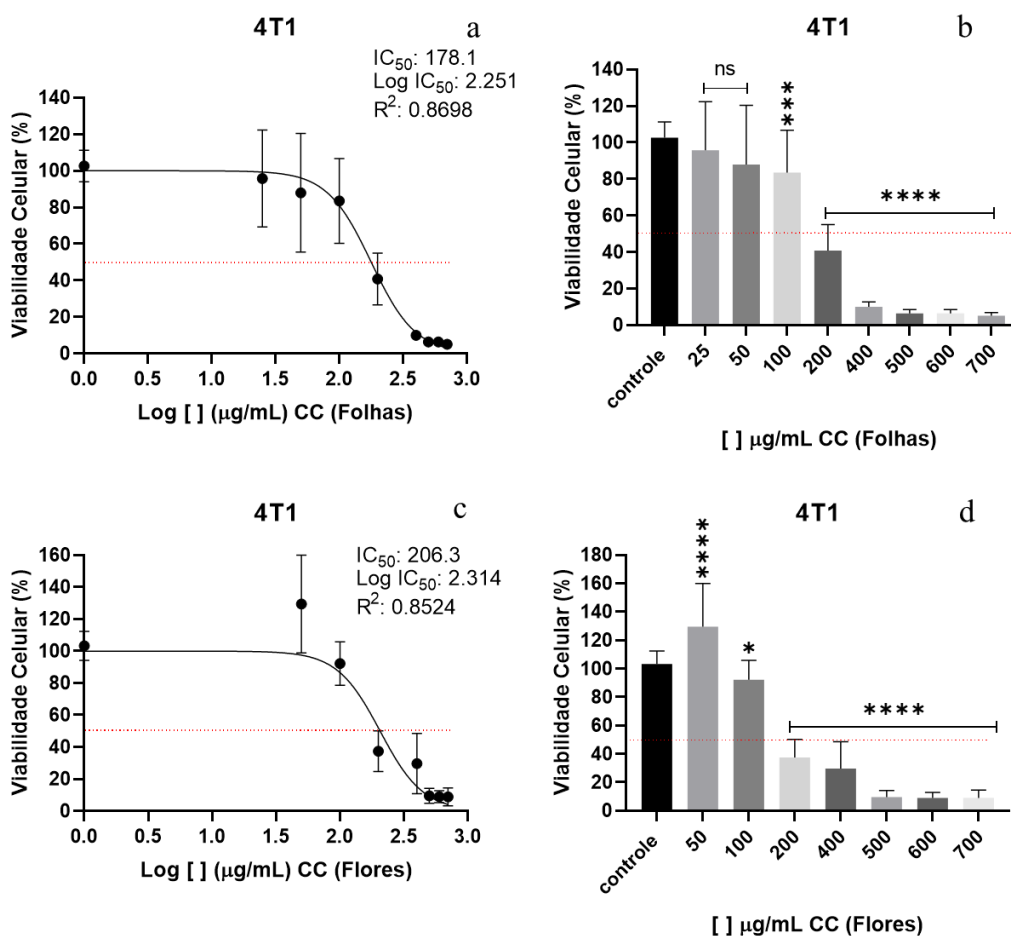


Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 12a, 12c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 12b, 12d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: \*\* (P = 0,004) e \*\*\*\* (P < 0,0001). Fonte: A autora.

Na linhagem de câncer de mama murino (4T1) o comportamento dos óleos foi similar (Figura 13). As menores concentrações (a partir de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) não exibiram reduções na viabilidade celular, enquanto as concentrações a partir de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  exibiram viabilidade

abaixo de 50 %. O  $IC_{50}$  calculado para o óleo das folhas foi de  $178,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o  $IC_{50}$  para o óleo das flores foi de  $206,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O valor mais baixo no óleo das folhas ocorreu em função da concentração de  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que teve redução de 90,26 % contra 71,34 % de redução na viabilidade na mesma concentração do óleo das flores. Assim como para o melanoma, a seletividade para o câncer de mama murino foi menor que 1, sendo 0,26 para as flores de *C. carpinifolia* e 0,48 para as folhas.

Figura 13 - Viabilidade das células 4T1 em função da concentração do óleo essencial das folhas (a; b) e das flores (c; d) de *Cantinoa carpinifolia* após 48h

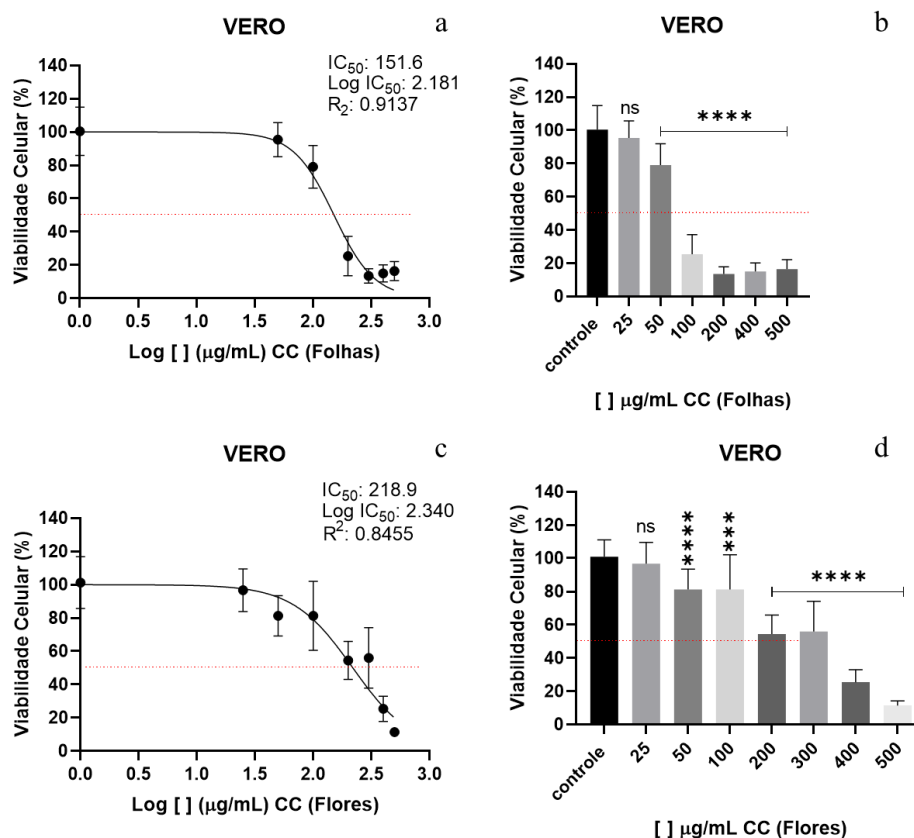


Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 13a, 13c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 13b, 13d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,76$ ), \* ( $P = 0,03$ ), \*\*\* ( $P = 0,0008$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

O óleo essencial das folhas de *C. carpinifolia* se mostrou mais citotóxico para a linhagem normal de primata (VERO) do que o óleo das flores (Figura 14). As concentrações de 100, 200, 400 e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo das folhas reduziram em 74,74 %; 86,57 %; 85,06 % e 83,66 % a viabilidade das células VERO, respectivamente (Figuras 14a e 14b). Enquanto as mesmas concentrações do óleo das flores (100, 200, 400 e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram reduções na

viabilidade de 60,17 %; 56,98 %; 72,17 % e 89,74 %, respectivamente (Figuras 14c e 14d). Isso pode se ver refletido nos valores de  $IC_{50}$  calculados, onde as folhas exibiram  $151,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  e as flores  $218,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

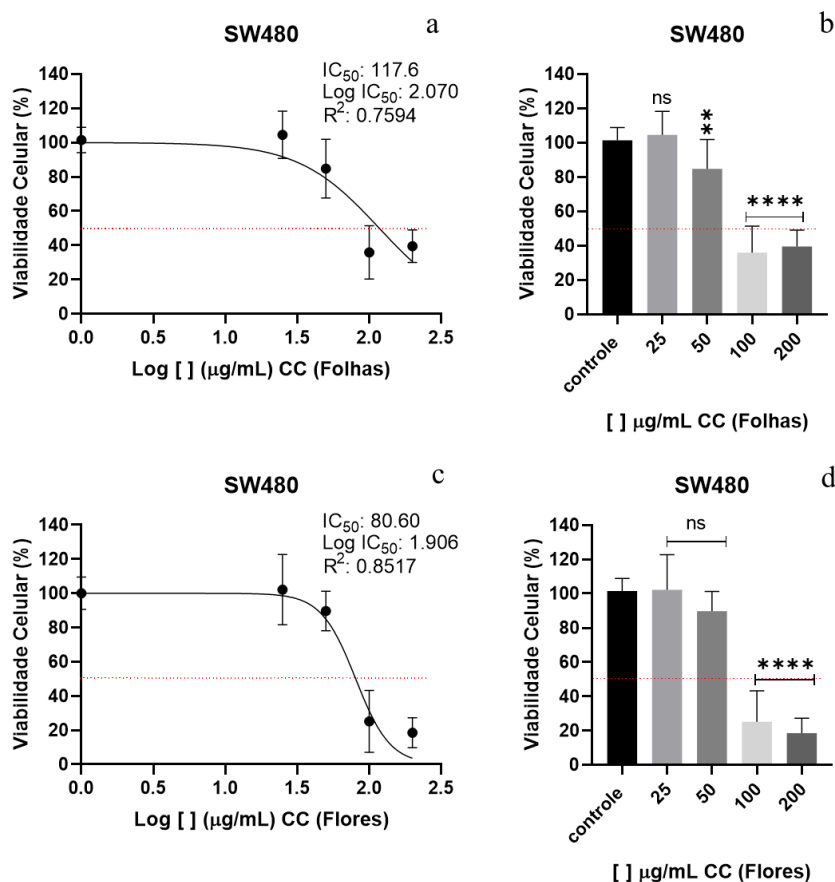
Figura 14 - Viabilidade das células VERO em função da concentração do óleo essencial das folhas (a; b) e das flores (c; d) de *Cantinoa carpinifolia* após 48h



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 14a, 14c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 14b, 14d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,88$ ), \*\*\* ( $P = 0,0003$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

Ao contrário do observado nas células VERO, a citotoxicidade do óleo essencial das flores foi maior do que a das folhas na linhagem de câncer colorretal humano (SW480) (Figura 15). Enquanto as concentrações de 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do óleo das flores reduziram 75,20 % e 81,80 % da viabilidade de SW480 (Figuras 15c e 15d), o óleo das folhas com 100 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  exibiram reduções de 64,58 % e 60,99 % (Figuras 15a e 15b). A concentração de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não exibiu toxicidade em nenhum dos dois óleos, visto que, as médias não foram diferentes do controle, segundo o teste de Dunnett a 0,5 %. Os valores de  $IC_{50}$  calculados para a linhagem SW480 foram  $117,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  com o óleo das folhas e  $80,60 \mu\text{g mL}^{-1}$  com o óleo das flores.

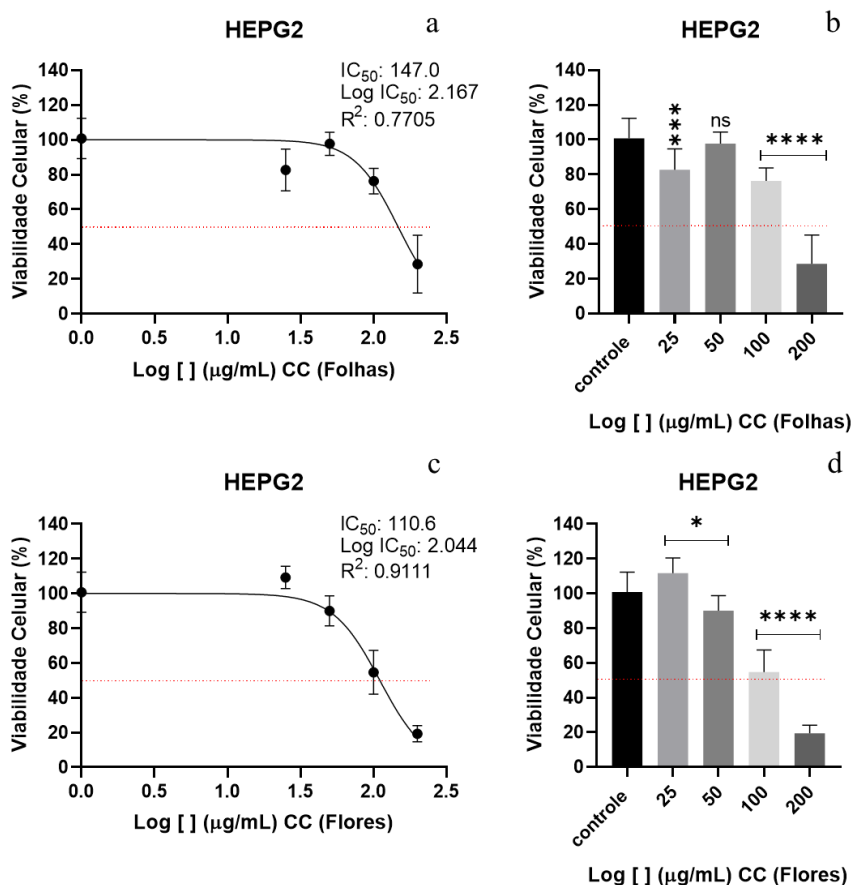
Figura 15 - Viabilidade das células SW480 em função da concentração do óleo essencial das folhas (a; b) e das flores (c; d) de *Cantinoa carpinifolia* após 48h



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 15a, 15c: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 15b, 15d: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,93$ ), \*\* ( $P = 0,002$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

Diferente do observado para as células SW480 em que as duas maiores concentrações dos óleos de CC reduziram mais de 50 % da viabilidade, nas células HEPG-2 apenas a maior concentração ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) teve esse efeito (Figura 16). O óleo das folhas de CC na concentração de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  reduziu 71,70 % da viabilidade das células HEPG-2, comparado ao controle (Figuras 16a e 16b). Enquanto o óleo das flores de CC na mesma concentração teve 80,86 % de redução na viabilidade. Com isso, o IC<sub>50</sub> calculado para o óleo das flores foi menor ( $110,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) do que o calculado para o óleo das folhas ( $147,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Portanto ambos apresentaram seletividades menores que 2 (1,37 para flores e 1,03 para folhas).

Figura 16 - Viabilidade das células HEPG-2 em função da concentração do óleo essencial das folhas (a; b) e das flores (c; d) de *Cantinoa carpinifolia* após 48h



Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Figuras 16a, 16c e 16e: regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células vivas); Figuras 16b, 16d e 16f: médias submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância. A diferença estatística com o controle foi representada pelos símbolos: (ns) não significativo ( $P = 0,93$ ), \* ( $P = 0,04$ ), \*\*\* ( $P = 0,0009$ ) e \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Fonte: A autora.

Os valores de IC<sub>50</sub> dos óleos de CR e CC foram calculados a partir da viabilidade celular e a partir dos dados de HillSlope do IC<sub>50</sub> foram calculados os valores de IC<sub>10</sub> e IC<sub>90</sub> que estão apresentados nas Tabelas 2 e 3 em Anexo. Todos esses valores obtidos foram considerados para o cálculo dos Índices de seletividades.

Considerando o IC<sub>90</sub> estimado para a linhagem 4T1, o óleo de folhas e flores de CR teria uma seletividade de 2,86 (Tabela 2 em Anexo). Fato não observado quando a seletividade foi calculada a partir dos valores de IC<sub>50</sub>, onde o IS foi de 1,11 (Tabela 4). Mesmo sendo um valor baixo, considerando uma boa seletividade a partir de 2, este foi o maior valor encontrado nas células murinas a partir dos valores de IC<sub>50</sub>.

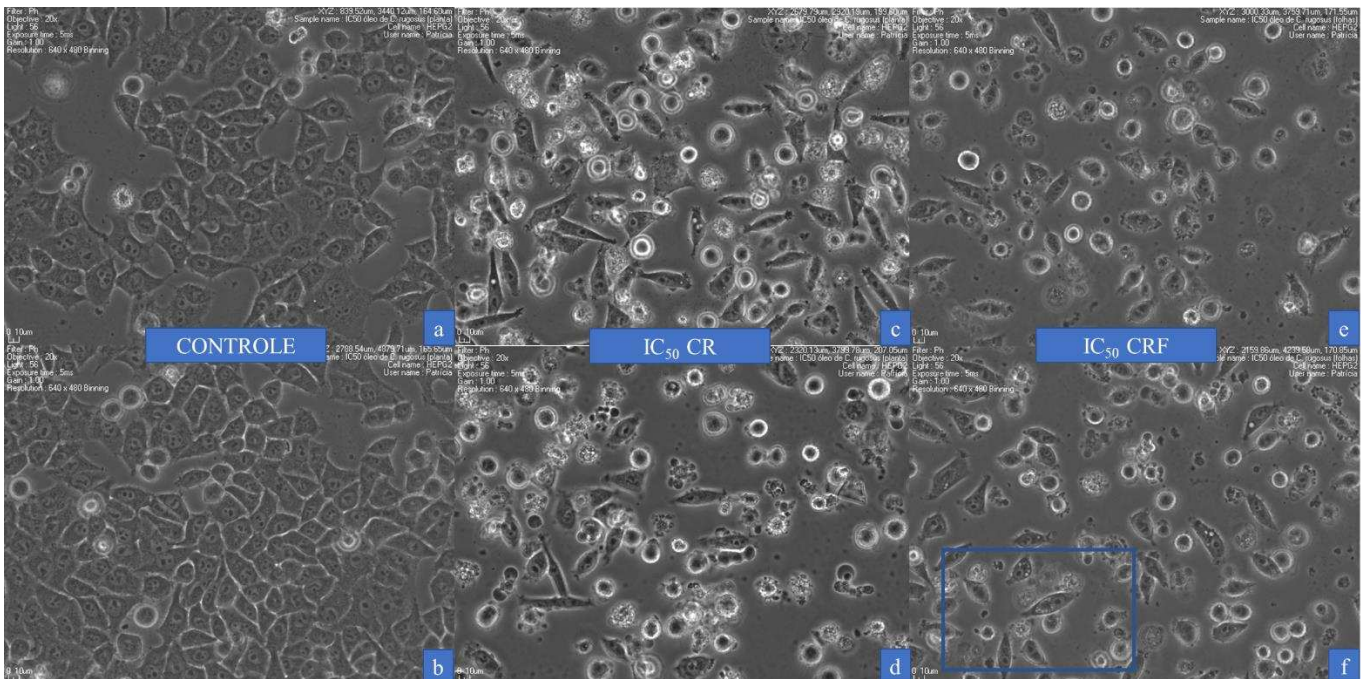
Para as células humanas, a melhor seletividade observada se manteve sendo na linhagem HEPG-2 com o óleo de folhas e flores de CR, considerando tanto o IC<sub>10</sub> como o IC<sub>90</sub> (Tabela 3

em Anexo). Porém, o valor de IS para o IC<sub>90</sub> (4,35) foi ligeiramente menor do que o calculado para o IC<sub>50</sub> (4,72) (Tabela 5). Entretanto tais valores nos trazem um dado farmacologicamente importante uma vez que a concentração de IC<sub>90</sub> deste óleo para a linhagem HEPG2 (69,6 µg mL<sup>-1</sup>) é menor do que a concentração de IC<sub>50</sub> para a linhagem normal Vero (132,7 µg mL<sup>-1</sup>), indicando que a elevação da concentração de uso deste óleo não acarretaria alta taxa de morte em células não tumorais. Para o óleo das flores de CC, a seletividade calculada a partir do valor estimado de IC<sub>90</sub> para as células SW480 foi maior do que o calculado para o IC<sub>50</sub> do mesmo óleo (4,57 x 2,71). A seletividade para as células HEPG-2 com o IC<sub>90</sub> também foi maior do que o calculado para o IC<sub>50</sub> (2,70 x 1,97). De forma similar a concentração de IC<sub>90</sub> para as linhagens tumorais é próxima da concentração de IC<sub>50</sub> da linhagem normal (218,9 µg mL<sup>-1</sup>), no caso da linhagem HEPG2 (248,9 µg mL<sup>-1</sup>) ou tem valor inferior a esta, como demonstrado pelo tratamento da linhagem SW480 com o óleo CR flores (IC<sub>90</sub> = 147 µg mL<sup>-1</sup>), demonstrando que doses elevadas deste óleo causaria poucos efeitos colaterais às células normais (Tabelas 2 e 3 em Anexos).

### **3.4 Avaliação da morfologia celular por aquisição de imagens após o tratamento com o IC<sub>50</sub> dos óleos essenciais de *C. rugosus* (CR) e *C. carpinifolia* (CC)**

Na figura 17 é possível comparar o efeito visual na morfologia das células da linhagem HEPG-2 que não receberam tratamento com os óleos, apenas com o DMSO (0,5 %), com as células que foram tratadas com o IC<sub>50</sub> do óleo de toda a planta de CR e com o IC<sub>50</sub> do óleo apenas das folhas de CR. Enquanto no controle as células se mantêm aderidas a superfície da placa com formatos mais geométricos, nos tratamentos observamos aproximadamente metade das células em formato circular ou “enrugado”, aparentemente não aderidas (Figuras 17c, 17d, 18e e 18f). Outras células parecem em transição de um formato geométrico para um formato mais pavimentoso / fusiforme. Essas células também aparentam possuir um maior número de projeções da membrana do tipo “blebs” (Figura 17f).

Figura 17 – Células da linhagem HEPG-2 tratadas com diferentes óleos essenciais de *Cyanocephalus rugosus* (CR) no aumento de 20x



Figuras 17a e 17b apresentam células do controle, tratadas com 0,5% de DMSO; Figuras 17c e 17d apresentam células tratadas com o  $IC_{50}$  do óleo essencial de flores e folhas de CR (CR) e as Figuras 17e e 17f apresentam células tratadas com o  $IC_{50}$  do óleo essencial apenas das folhas de CR (CRF). Estão representadas duas imagens obtidas de campos diferentes para cada tratamento. Fonte: A autora.

Na figura 18 é possível observar a área demarcada na figura 17f nos aumentos de 40x (Figura 18a) e 80x (Figura 18b). Nesta é possível observar células mortas e células em processo de morte celular, com grandes corpos multivesiculares em seus interiores. As células mortas parecem manter o limite celular sem rupturas.

Figura 18 – Células da linhagem HEPG-2 tratadas com o óleo essencial das folhas de *Cyanocephalus rugosus* (CRF)

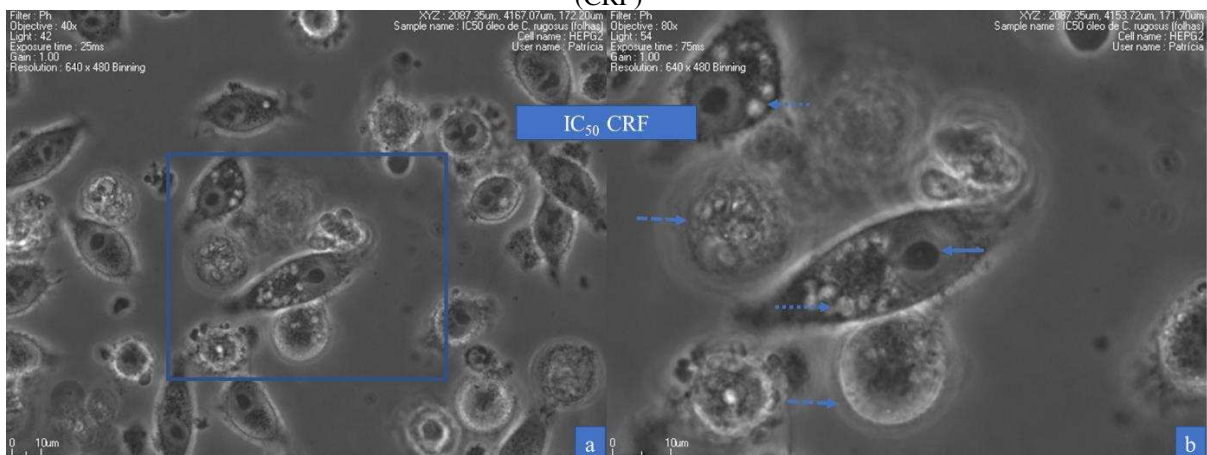


Figura 18a mostra um aumento de 40x e Figura 18b mostra um aumento de 80x da área delimitada na Figura 18a. Seta sólida indica núcleo condensado, setas com ponto redondo indicam vacúolos intracelulares e setas com ponto quadrado indicam células mortas com limite celular íntegro. Fonte: A autora.

Dos 4 timelapses montados com as células HEPG-2 durante as 24 horas de tratamento das células com o IC<sub>50</sub> do óleo de flores e folhas de CR, 2 deles estão disponíveis nos links abaixo, hospedados no google drive e livre de vírus. 73 fotos foram agrupadas, em cada vídeo, que possuem 7 segundos cada. Nos vídeos é possível observar o processo de morte celular.

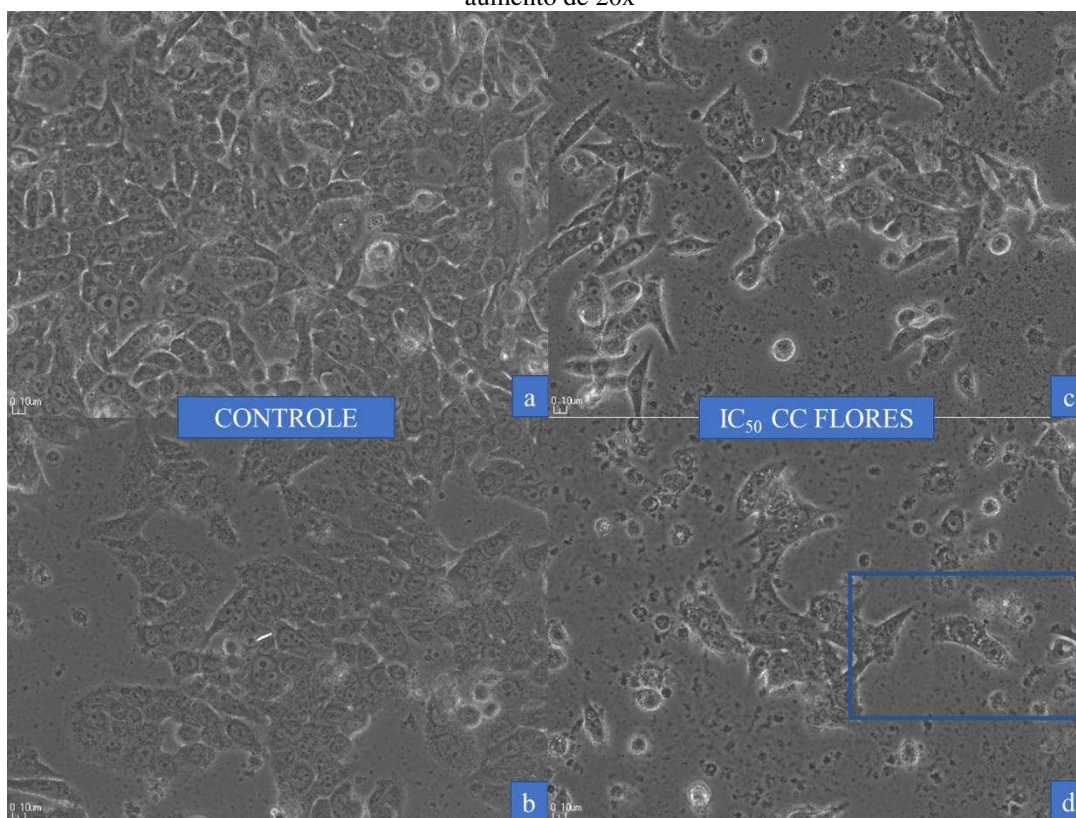
Ponto 1: <https://drive.google.com/file/d/1oGcIv7jjjordWi9lcSSK0vds9ZyWwC7q/view?usp=sharing>

Ponto 11:

[https://drive.google.com/file/d/1cm\\_gEmb33lmdAp0J8VgNMmLCDiqRYCCg/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1cm_gEmb33lmdAp0J8VgNMmLCDiqRYCCg/view?usp=sharing)

As células da linhagem SW480 tratadas com o óleo essencial das flores de *C. carpinifolia* (CC FLORES) aparentam sofrer menos mudanças morfológicas, comparado as células do controle, porém um número menor de células foi observado decorridas as 24 horas de tratamento (Figura 19).

Figura 19 – Células da linhagem SW480 tratadas com o óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* (CC) no aumento de 20x



Figuras 19a e 19b apresentam células do controle, tratadas com 0,5% de DMSO; Figuras 19c e 19d apresentam células tratadas com o IC<sub>50</sub> do óleo essencial de flores de CC. Estão representadas duas imagens obtidas de campos diferentes para cada tratamento. Fonte: A autora.

Na figura 20 é possível observar a área demarcada na figura 19d nos aumentos de 40x (Figura 20a) e 80x (Figura 20b). Aqui podemos observar células mortas, células em processo de morte celular, com grandes corpos multivesiculares em seus interiores e núcleo condensado. Além da presença de debris (vestígios de células mortas).

Figura 20 – Células da linhagem SW489 tratadas com o óleo essencial das flores de *Cantinoa carpinifolia* (CC FLORES)

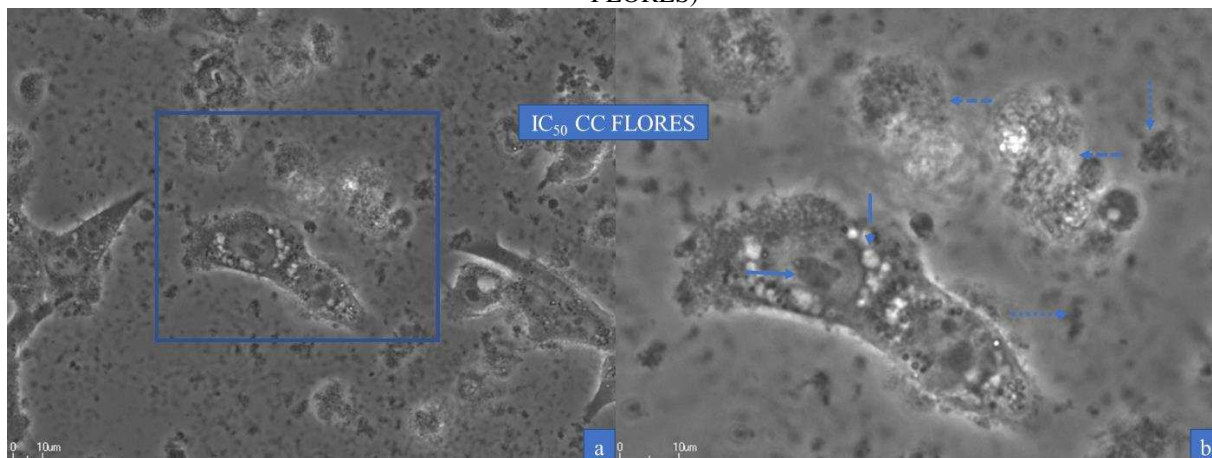
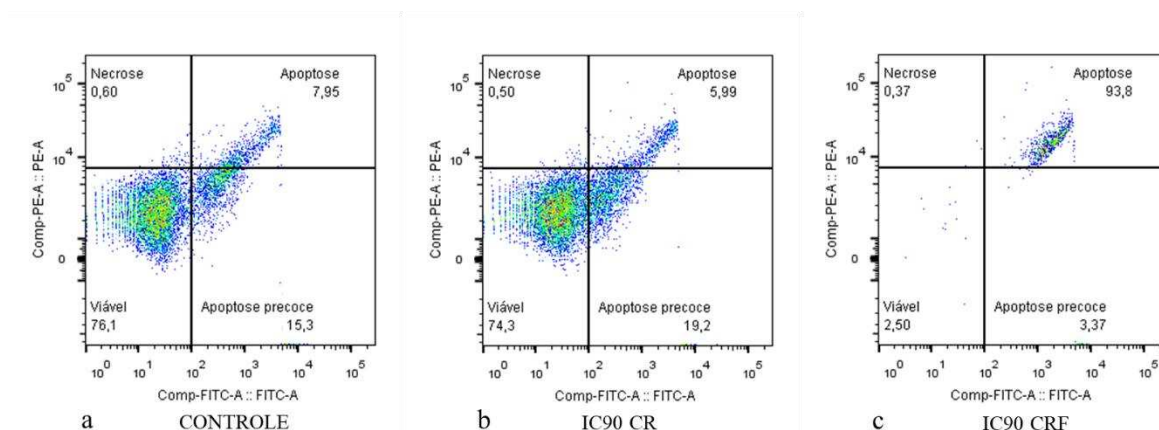


Figura 20a mostra um aumento de 40x e Figura 20b mostra um aumento de 80x da área delimitada na Figura 20a. Seta sólida indica núcleo condensado, setas com ponto redondo indicam debris, setas com ponto quadrado indicam células mortas com limite celular íntegro e seta com tracejado longo indica corpos multivesiculares. Fonte: A autora.

### 3.5 Avaliação do tipo de morte celular e do ciclo celular por Citometria de Fluxo

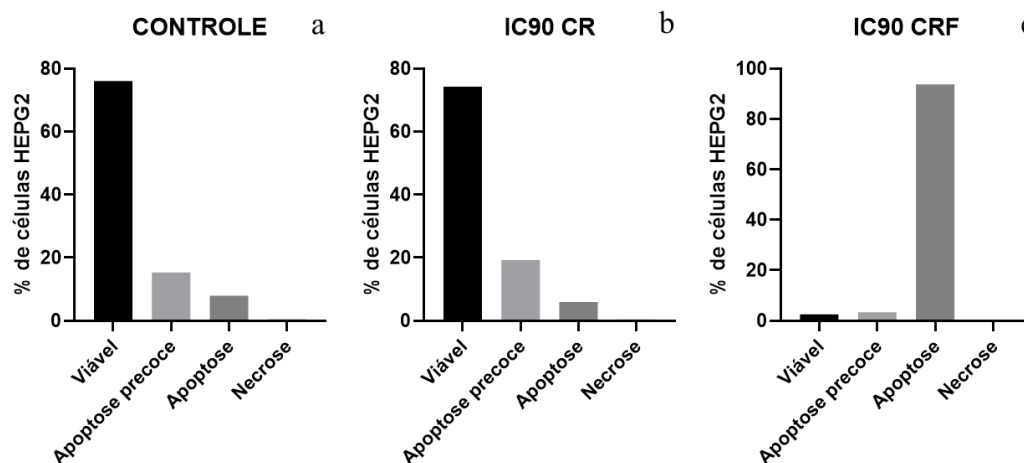
O tratamento com o óleo essencial de flores e folhas de *C. rugosus* (CR) obteve seletividade de 4,72 para a linhagem de câncer de fígado humano (HEPG-2) e o óleo essencial apenas das folhas de *C. rugosus* (CRF) obteve 1,60. Analisando o tipo de morte celular utilizando o kit de proteína Anexina V conjugada ao fluoróforo FITC (ImunoTools®, Friesoythe, NI, Alemanha) e o iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) foi identificada a morte por apoptose em 97,17% das células, quando essas foram tratadas com o IC<sub>90</sub> de CRF (Concentração de 100,73  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 21c e 22c). O tratamento com o IC<sub>90</sub> de CR (Concentração de 69,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) nas células HEPG-2, por 24h, se manteve similar ao observado no controle (Figura 21b e 22b)

Figura 21 – Determinação do tipo de morte celular induzida na linhagem HEPG-2 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do óleo essencial de folhas e flores de *Cyanocephalus rugosus* (CR) e com o IC90 do óleo essencial das folhas de *Cyanocephalus rugosus* (CRF). Necrose (Q1): células positivas para o iodeto de propídeo; Apoptose (Q2) marcação dupla com iodeto e anexina V; Viável (Q3): células sem marcador; Apoptose precoce (Q4): positivas apenas para a Anexina V. Fonte: A autora.

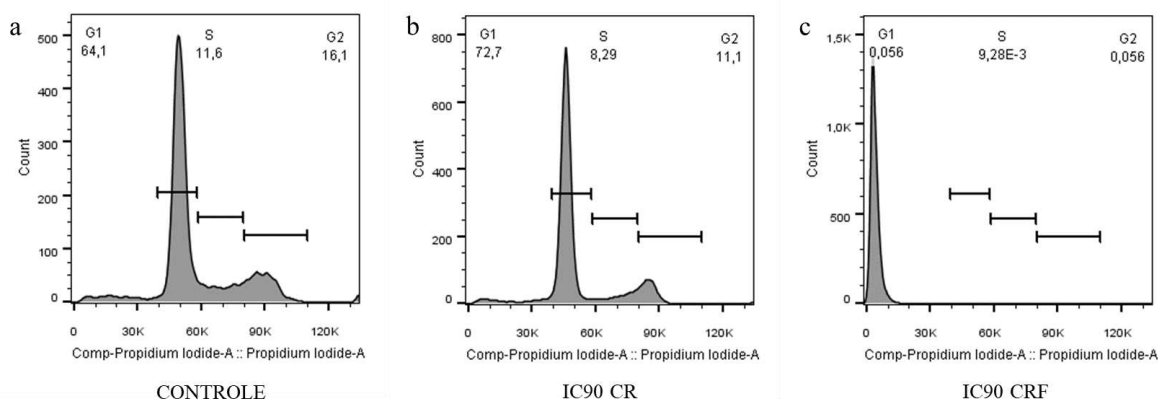
Figura 22 – Determinação do tipo de morte celular induzida na linhagem HEPG-2 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do óleo essencial de folhas e flores de *Cyanocephalus rugosus* (CR) e com o IC90 do óleo essencial das folhas de *Cyanocephalus rugosus* (CRF). Fonte: A autora.

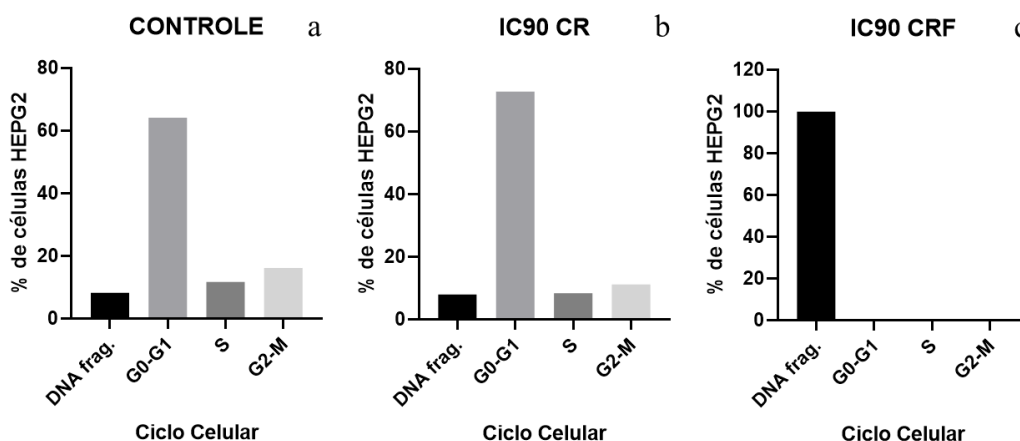
A análise do ciclo celular das células HEPG-2 tratadas com os valores de IC<sub>90</sub>, calculados para cada óleo, durante 24 horas, mostraram uma manutenção do ciclo celular com o óleo de flores e folhas, comparado ao controle (Figuras 23b e 24b). E o óleo apenas das folhas de *C. rugosus* alterou visivelmente o ciclo das células HEPG-2 (Figuras 23c e 24c). Baseado nos dados de ciclo celular das células do controle e visando manter a proporção entre as fases do ciclo equivalentes após os tratamentos, nós calculamos os valores esperados para cada fase. Visto que após o tratamento com o IC<sub>90</sub> de CR, foram observadas 72,7 % das células na fase G0-G1, deveriam estar na fase S 13,15 %, na fase G2-M, 18,26 % e; 9,30 % de DNA deveria estar fragmentado. A proporção observada após o tratamento foi de 8,29 % na fase S, 11,1 %, na fase G2-M, e 7,91 % de DNA fragmentado (Figuras 23b e 24b). Valores menores do que o esperado, porém, a própria fase G0-G1 teve um aumento, comparado ao controle. Ela subiu de 64,1 % para 72,7 %. Quando observamos as células após 24h de tratamento com o IC<sub>90</sub> de CRF, a fase G0-G1 sofreu uma redução de 64,1 para 0,056 %, comparado ao controle, e as fases S e G2-M mantiveram a proporção esperada (0,010 e 0,009 % na fase S) e (0,014 e 0,056 % na fase G2-M), esperada e observada, respectivamente (Figuras 23c e 24c). Por outro lado, a quantidade de DNA fragmentado subiu de 0,0071, do esperado, para 99,87 %.

Figura 23 – Análise do Ciclo Celular na linhagem HEPG-2 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do óleo essencial de folhas e flores de *Cyanocephalus rugosus* (CR) e com o IC90 do óleo essencial das folhas de *Cyanocephalus rugosus* (CRF). G1 (G0-G1), S e G2 (G2-M) observados nos tratamentos. Fonte: A autora.

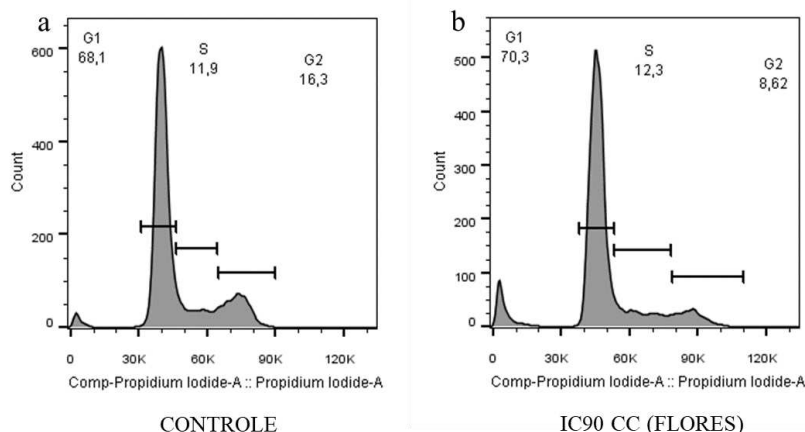
Figura 24 – Análise do Ciclo Celular na linhagem HEPG-2 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do óleo essencial de folhas e flores de *Cyanocephalus rugosus* (CR) e com o IC90 do óleo essencial das folhas de *Cyanocephalus rugosus* (CRF). Fonte: A autora.

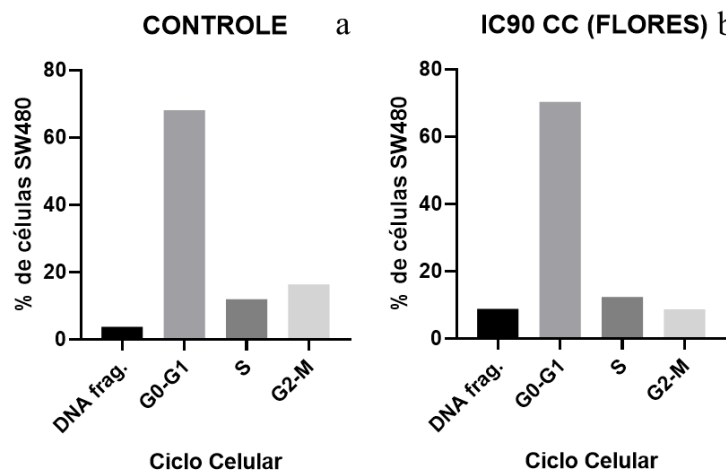
Dentre os tratamentos com os óleos essenciais de *C. carpinifolia*, o óleo das flores apresentou melhor seletividade contra a linhagem de câncer colorretal humano (SW480) com valor de 2,71. Ele foi selecionado para análise do ciclo celular. Comparado ao controle, o ciclo não sofreu grandes alterações (Figura 25b e 26b). Como foram observadas 70,3 % das células na fase G0-G1, para manter a proporção do ciclo, 12,28 % deveriam estar na fase S; 16,82 % na fase G2-M e 3,81 % de DNA fragmentado. O tratamento com o IC<sub>90</sub> de CC Flores (Concentração de 248,55  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) aumentou levemente a porcentagem de DNA fragmentado (8,78 %), reduziu G2-M (8,62 %) e manteve a fase S equivalente (12,3 %).

Figura 25 – Análise do Ciclo Celular na linhagem SW480 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do óleo essencial de flores de *Cantinoa carpinifolia* (CC Flores). G1 (G0-G1), S e G2 (G2-M) observados nos tratamentos. Fonte: A autora.

Figura 26 – Análise do Ciclo Celular na linhagem SW480 por Citometria de Fluxo



(a) Células sem tratamento, controle; (b) Células após 24h de contato com IC90 do óleo essencial de flores de *Cantinoa carpinifolia* (CC Flores). Fonte: A autora.

## 4 DISCUSSÃO

Os óleos essenciais são misturas naturais líquidas, voláteis, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos com densidade, geralmente mais baixa que a da água. São metabolizados por plantas aromáticas como metabólitos secundários e podem ser sintetizados por todos os órgãos da mesma e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (Croteau *et al.* 2000). Eles são caracterizados por dois ou três componentes principais em concentrações maiores (20–70 %) em comparação aos demais componentes presentes. Geralmente, esses componentes principais determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (Pichersky *et al.* 2006).

Todos os quatro óleos obtidos apresentaram forte odor, consistente com outras espécies da família Lamiaceae, como manjeriço e hortelã. Botanicamente, os gêneros *Cyanocephalus* e *Cantinoa* também podem ser encontrados na literatura como *Hyptis*, uma vez ele é um sinônimo botânico dentro da taxonomia da subtribo Hyptidinae (Sedano-Partida *et al.* 2020). Na espécie *Hyptis pectinata* foram identificados  $\beta$ -cariofileno (30,2 %), óxido de cariofileno (7,1 %), espatulenol (6,9 %), biciclogermacreno (4,9 %),  $\beta$ -pineno (3,7 %) e 5- isopropenil-1-metil-1-ciclohexeno (3,41 %), além de outros 21 componentes, representando 87,88% do óleo (Pereira 2014). Para *C. rugosus* também observamos, entre os compostos majoritários, predomínio de  $\beta$ -cariofileno (22,84 % e 12,51 %), presença de germacreno D (19,97 % e 16,11 %) e espatulenol (8,30 % e 12,16 %) nos óleos das folhas e flores e no óleo de suas folhas, respectivamente. O óxido de cariofileno (6,49 %) também foi um composto majoritário no óleo das folhas de *C. rugosus* e no óleo das folhas e flores sua presença correspondeu a 4,72 %.

O composto majoritário dos óleos de flores (CC Flor) e folhas (CC Folha) de *C. carpinifolia* foi o mesmo,  $\alpha$ -tujona, com pequena variação nos teores, sendo CC Flor 46,05 % e CC Folha 43,13 %. Os componentes espatulenol e sabineno também foram identificados em ambos os óleos, com maiores concentrações em CC Folha. Isocariofileno,  $\alpha$ -Copaene, óxido de cariofileno e  $\beta$ -tujone foram comuns aos óleos de *C. carpinifolia*, porém em concentrações distintas. Os compostos  $\beta$ -pineno e lavandulol foram exclusivos do óleo CC Folha e os compostos mirceno, terpinoleno, Cis-verbenol, E- $\beta$ -farneseno, germacreno B e cadineno  $\delta$  foram encontrados apenas do óleo CC Flor. Os resultados são condizentes com o descrito para outra espécie de *Hyptis* também cultivada em Minas Gerais (Lavras -MG). No óleo essencial de *Hyptis marrubioides* foram identificados  $\alpha$ -tujona,  $\beta$ -tujona, linalol,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -cariofileno, germacreno D, cariofilenol, cedrol e cadaleno, correspondendo a aproximadamente 75% do total do óleo em uma mistura complexa (Botrel *et al.* 2010).

Segundo Sá *et al.* (2016) *Hyptis carpinifolia* apresentou variabilidade química sazonal dos óleos essenciais extraídos das folhas durante 12 meses. Os componentes majoritários foram 1,8-cineol (39,6-61,8 %), trans-cadina-1 (6), 4-dieno (2,8-17,5 %),  $\beta$ -cariofileno (4,4-10,0 %), prenopsan-8 -ol (4,2-9,6 %) e  $\beta$ -pineno (2,9-5,3 %) (Sá *et al.* 2016). Indicando que a época de colheita tem tanta influência na composição dos óleos essenciais, quanto a localização geográfica, disponibilidade de água, temperatura e luminosidade.

Em um outro estudo, avaliando a composição do óleo essencial das folhas de *C. carpinifolia* foram encontradas altas concentrações dos monoterpenos  $\alpha$ -tujona (38,14 %) e  $\beta$ -tujona (22,43 %), além de  $\beta$ -cariofileno (7,28 %), cis-pinocanfeno (5,55 %), sabineno (5 %) e

germacreno-D (4,35 %). Constituintes relacionados a sua atividade antibacteriana, onde a concentração mínima bactericida foi 6,25  $\mu\text{L mL}^{-1}$  em *Escherichia coli* e 0,39  $\mu\text{L mL}^{-1}$  em *Staphylococcus aureus* (Camargo *et al.* 2019). Teixeira e colaboradores (2023) também identificaram  $\alpha$ -tujona (32,15 %) e  $\beta$ -tujona (22,22 %) no óleo essencial de *C. carpinifolia*. Os estudos de Camargo *et al.* (2019) e Teixeira *et al.* (2023) corroboram nossos achados para a presença de  $\alpha$ -tujona como composto majoritário no óleo essencial de *C. carpinifolia* e os estudos de Sá *et al.* (2016) indicam para a presença de quimiotipos produtores de eucaliptol dentro da espécie, uma vez que *Hyptis carpinifolia* é um sinônimo botânico de *Cantinoa carpinifolia*. De fato, também identificamos a presença de eucaliptol no óleo de *C. carpinifolia*, porém as concentrações foram inferiores, com 0,78 % nas flores e 1,07 % nas folhas.

Representantes de *Hyptis* também foram encontradas no semiárido nordestino. A análise do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* identificou 25 componentes (94,31 %) incluindo eucaliptol (35,8 %), exo-fenhol (6,4 %),  $\gamma$ -cadineno (6,3 %), 3-careno (5,9 %), biciclogermacreno (5,5 %) e  $\beta$ -pineno (4,9 %). Na espécie *Hyptis martiusii* apenas 5 componentes foram identificados, representando 85,45 % do óleo:  $\alpha$ -cadinol (36,0 %), seguido por 2,6-octadieno-1,8-diol, 2,6-dimetil- (12,0 %) e  $\beta$ -eudesmol (12,3 %) (Pereira 2014).

Comparando o óleo das folhas de *C. carpinifolia* com suas flores foi observada a sobreposição de aproximadamente 26 componentes, com variação em seus teores. As concentrações de  $\alpha$ -Tujona (43,13 %, 46,049 %) foram as mais representativas nas folhas e nas flores, respectivamente. Resultados experimentais mostram que a manifestação fenotípica e a quantidade de tujonas nos óleos essenciais dependem, além das condições ambientais externas, do órgão da planta e de sua fase de desenvolvimento (Németh and Nguyen 2020).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, atração de polinizadores, antifúngicos, inseticidas e também evitando a ação de herbívoros (Bakkali *et al.* 2008). Foi demonstrado que ambas as formas diastereoisoméricas da cetona monoterpênica tujona,  $\alpha$ -tujona e  $\beta$ -tujona atuam como inseticida ao inibir a atividade da carboxilesterase nas formigas operárias (*Solenopsis invicta*) (Xie *et al.* 2019). Também foram demonstrados seus efeitos anticâncer na linha celular de melanoma maligno (A37) através da fragmentação de DNA, colapso do potencial transmembrana mitocondrial, aumento na geração de EROs e liberação de ativação de citocromo c e caspase-3, eventos intimamente relacionados com a indução de apoptose (Biswas *et al.* 2011).

Curiosamente nossos resultados mostraram que o IC<sub>90</sub> do óleo de folhas e flores de *C. rugosus* (CR), que apresentaram o melhor IS = 4,72, não apresentaram diferenças significativas com o controle no ensaio de morte celular das células HEPG-2, porém o óleo das folhas de *C. rugosus* (CRF) aumentaram em 4,17 vezes o número de células apoptóticas, comparado ao controle. O mesmo foi observado no ensaio que avaliou as proporções do ciclo celular, apenas o óleo das folhas de CR alterou significativamente o ciclo, com aumento expressivo na fragmentação do DNA.

Na avaliação da morfologia das células HEPG-2, os 2 óleos de CR na concentração do IC<sub>50</sub> tiveram efeitos similares modificando o formato, aumentando o número de projeções da membrana e induzindo a morte celular com aumento da sua vacuolização. Já nas células SW480 tratadas com o IC<sub>50</sub> do óleo das flores de CC, rico em  $\alpha$ -tujona, não foram observadas mudanças morfológicas nas células nem alterações no ciclo celular, comparados aos controles.

O mecanismo de ação de  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona também foi investigado em células de câncer de ovário humano (ES2) e (OV90). Foram observadas inibição na proliferação, indução de morte celular através de vias apoptóticas intrínsecas dependentes de caspase e estresse do retículo endoplasmático associado à perda das funções mitocondriais e à alteração do padrão metabólico das células (Lee *et al.* 2020). A  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona também atenuaram a formação de vasos sanguíneos em peixes-zebra transgênicos, o que implica um potencial antiangiogênico (Lee *et al.* 2020).

Outra espécie da família Lamiaceae que mostrou efeito citotóxico contra células de melanoma de camundongo (B16F10), além de células de carcinoma de ovário humano (A2780) e células de carcinoma de cólon humano (HCT) por ensaio MTT, foi *Stachys parviflora* (Shakeri *et al.* 2019). Já *Prunella vulgaris*, também da família Lamiaceae, foi reportada como tendo atividade anticâncer contra células do câncer de mama (MCF-7) *in vitro* e *in vivo* através da indução de apoptose, parada do ciclo celular, inibição da angiogênese e modulação da sinalização PI3K/AKT (Gao *et al.* 2019).

O óleo essencial das folhas de *Cantinoa althaeifolia* exibiu citotoxicidade contra melanoma murino (B16F10) e células de carcinoma de mama humano (MCF-7) com valores de IC<sub>50</sub> de 99,39  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 31,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A toxicidade exibida em fibroblastos murinos (3T3) e células não tumorais (McCoy) foi menor de forma que o índice de seletividade (IS) do óleo foi de 2.66 para MCF-7 e 0.8 para B16F10 (Urban *et al.* 2021). Os componentes  $\gamma$ -himachalene (11,62 %), espatulenol (10,08 %), óxido de cariofileno (9,93 %), (E)-cariofileno (9,21 %) e pogostol (6,31 %), foram descritos como majoritários e associados a mudanças morfológicas

como condensação da cromatina, arredondamento das células e formação de bolhas (Urban *et al.* 2021). Tais mudanças foram condizentes com nossos achados que identificaram modificações no formato, associados a perda da comunicação entre células e com o substrato, aumento no número de projeções do tipo “blebs” e sinais de morte celular com aumento da presença de corpos apoptóticos em forma de vacúolos, nas células HEPG-2, tratadas com os óleos de CR.

A baixa seletividade em melanoma observada por Urban e colaboradores (2021) também foi observada por nós, para o melanoma e também para o câncer de mama, ambos murinos, com os óleos de *C. carpinifolia*. As melhores seletividades foram encontradas para o câncer colorretal com os óleos das flores (2,71) e folhas (1,28) de *C. carpinifolia*. Já o óleo de folhas e flores de *C. rugosus* apresentou seletividades maiores que 1 (1,11) para o câncer de mama murino e para o câncer colorretal (1,89) e maior que 3 para o câncer de fígado humano (4,72). O óleo extraído apenas das folhas de CR apresentou seletividades iguais a 1,45 para a linhagem colorretal e 1,60 para os hepatócitos do fígado.

A diferença nos efeitos dos óleos de CR pode ser reflexo das diferenças nas composições químicas de ambos. Apesar da sobreposição de 24 compostos, os seus percentuais foram diferentes como exemplo do  $\beta$ -cariofileno que representava 22,84 % nas folhas e flores e apenas 12,51 % nas folhas. Outros compostos foram exclusivos, como  $\beta$ -Copaeno,  $\alpha$  – Amorfenol,  $\alpha$  – Muroleno, Viridiflorol e tau-Murolol que só foram identificados nas folhas e 1,10-di-epi-Cubenol que só foi identificado no óleo contendo folhas e flores.

A espécie *C. rugosus* se mostrou rica em sesquiterpenos (C15), enquanto *C. carpinifolia* foi rica em monoterpenos (C10). O óleo de *Piper boehmeriifolium* (Piperaceae), também rico em sesquiterpenos, como  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno, espatulenol e germacreno D, mostrou atividade antioxidante, antibacteriana e atividade citotóxica em células de carcinoma hepatocelular humano (HEPG-2) e células de câncer de mama humano (MCF-7) (Wang *et al.* 2020). Contendo 78,7 % de sesquiterpenos em sua composição, principalmente  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e óxido de humuleno, o óleo essencial das folhas de *Didymocarpus tomentosa* (Gesneriaceae) exibiu citotoxicidade contra célula tumoral HeLa com IC<sub>50</sub> de 11,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Gowda *et al.* 2012).

Ambas as espécies de Lamiaceae aqui estudadas apresentaram compostos majoritários pertencentes ao grupo dos terpenos. Classe de metabólitos mais numerosa e estruturalmente diversa do reino vegetal, com mais de 35.000 diferentes terpenos caracterizados (Twaij e Hasan,

2022). Embora classificados como metabólitos secundários, eles desempenham também funções no metabolismo primário atuando desde o crescimento vegetal (giberelina, brassinosteróide e ácido abscísico) até em derivados de pigmentos fotossintéticos como clorofilas e carotenóides. Podem estar envolvidos em respostas a estímulos bióticos, como ataques de patógenos e herbívoros (Barros et al. 2023). E estímulos abióticos como proteção contra raios ultravioleta-B (Takshak e Agrawal, 2019). Diferentes terpenos já tiveram atividades anticâncer descritas, como o ácido betulínico (Zuco *et al.*, 2002), a criptotanshinona (Chen *et al.* 2013) e o terpinoleno (Aydin *et al.* 2013).

O sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno, composto majoritário de *C. rugosus*, foi responsável por aumentar a atividade anticâncer de  $\alpha$ -humuleno e isocariofileno em células MCF-7. O  $\alpha$ -humuleno e isocariofileno ( $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) inibiram o crescimento celular em 50 % e 69 %, respectivamente, em comparação com 75 % e 90 % quando combinado com  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\beta$ -cariofileno (Legault and Pichette 2007). Também foi demonstrado que o  $\beta$ -cariofileno contribuiu para aumentar em aproximadamente 10 vezes a atividade citotóxica do paclitaxel em células de adenocarcinoma colorretal (DLD-1), quando em uso combinado. Provavelmente em função do aumento da permeabilidade da membrana devido ao acúmulo de  $\beta$ -cariofileno na bicamada lipídica, alterando sua permeabilidade ao medicamento (Legault and Pichette, 2007).

Interessante destacar a aparente predominância do álcool sesquiterpeno espatulenol em espécies de Lamiaceae, sendo o único componente encontrado em comum entre *C. rugosus* e *C. carpinifolia*. O espatulenol apresenta uma diversidade de atividades biológicas. Frações hexânicas de folhas de *Ocotea notata* (Lauraceae) ricas em espatulenol exibiram atividade antimicobacteriana contra as cepas de *Mycobacterium bovis* e *M. tuberculosis* através da inibição da produção de óxido nítrico e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), em macrófagos (RAW 264) (Costa *et al.* 2021). O espatulenol também foi relacionado a atividade antimelanoma dos extratos de *Ephedranthus pisocarpus* (Annonaceae) contra células B16F10 ( $\text{IC}_{50} = 46,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e SK-MEL-28 ( $\text{IC}_{50} = 40,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), atuando através de um mecanismo dependente de apoptose (Santos *et al.* 2020). A apoptose é um fenômeno comum entre organismos multicelulares e representa o processo de morte celular programada (Ma *et al.* 2019).

Considerando que, na literatura os índices de seletividade são considerados interessantes a partir de  $\text{IS} = 2$  (Suffness e Pezzuto, 1990), o óleo essencial das flores de *C. carpinifolia* atingiram esse pré-requisito com seletividade de 2,71 contra o câncer colorretal e o óleo de folhas e flores de *C. rugosus* contra o câncer de fígado com seletividade de 4,72. Da mesma

forma, os valores de  $IC_{50}$  encontrados foram maiores do que o recomendado por Suffness e Pezzuto,  $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g ml}^{-1}$  (1990), com excessão do óleo de folhas e flores de *C. rugosus* para o câncer de fígado que teve  $IC_{50}$  de  $28,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Nossos achados demonstraram que os óleos essenciais de *C. rugosus* e *C. carpinifolia* não são promissores para o desenvolvimento de fármacos contra o melanoma e câncer de mama em função da baixa seletividade, porém o óleo das flores de *C. carpinifolia* se mostrou ativo e com seletividade elevada contra o câncer colorretal e o óleo de folhas e flores de *C. rugosus* se mostrou ativo e seletivo contra o câncer de fígado, inclusive seguindo os parâmetros de Suffness e Pezzuto de 1990. Considerando que a composição química do óleo essencial de *C. rugosus* foi descrita pela primeira vez e carecem estudos avaliando o potencial biológico de ambas as espécies, seria pertinente também avaliar as atividades antifúngica, herbicida e inseticida para melhor compressão das potencialidades das espécies.

## 5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais da espécie *C. rugosus* se mostraram ricos em sesquiterpenos, como o  $\beta$ -cariofileno e o Germacreno D, enquanto os óleos de *C. carpinifolia* apresentaram elevadas concentrações de monoterpenos como  $\alpha$ -tujona. Embora tenha sido observada redução na viabilidade das células de melanoma murino e câncer de mama murino, principalmente com os óleos obtidos de *C. rugosus*, a viabilidade das células normais foi duramente afetada nas mesmas concentrações, indicando a necessidade de mais estudos visando aprimorar essa seletividade. Para o câncer colorretal humano, o óleo das flores de *C. carpinifolia* se mostrou uma fonte promissora de compostos citotóxicos com menores efeitos nas células normais. Assim como, o tratamento com o óleo das folhas e flores de CR no câncer de fígado humano. O mecanismo de ação foi melhor definido para o óleo das folhas de CR com indução da apoptose e fragmentação do DNA, sendo necessários mais testes para confirmar o mecanismo de diminuição da viabilidade celular induzido pelo óleo das folhas e flores de CR e das flores de CC. Com base apenas na morfologia das células é possível identificar a morte celular acontecendo nesses tratamentos, porém a via de sinalização que culminou nesses eventos continua não identificada.

## CONCLUSÃO GERAL

Os extratos das sementes de *P. edulis* e *P. setacea* se mostraram ricos nos ácidos graxos linoléico, oleico e palmítico e exibiram seletividades satisfatórias para o melanoma murino (IS de SPS = 2,64) e para o câncer colorretal humano nos quais as seletividades chegaram a 8,03 para o extrato SPS e 10,91 para o extrato SPE. O ácido palmítico exibiu seletividade de 2,19 para o câncer de mama murino. Os óleos essenciais da espécie *C. rugosus* se mostraram ricos em sesquiterpenos, como o  $\beta$ -cariofileno e o Germacreno D, enquanto os óleos de *C. carpinifolia* apresentaram elevadas concentrações de monoterpenos como  $\alpha$ -tujona. O tratamento com o óleo essencial de flores e folhas de *C. rugosus* obteve seletividade de 4,72 para a linhagem de câncer de fígado humano e o óleo de flores de *C. carpinifolia* exibiu seletividade de 2,71 para o câncer colorretal humano. O mecanismo de ação dos tratamentos parece envolver a ativação da morte celular por apoptose com a vacuolização das células e fragmentação do DNA, porém a via de sinalização que culminou nesses eventos continua não identificada. Esses achados indicam que os extratos de sementes de *P. edulis* e *P. setacea* e os óleos essenciais de *C. rugosus* e *C. carpinifolia* possuem atividade antitumoral com seletividades promissoras e podem ser considerados no desenvolvimento de quimioterápicos de origem natural, uma vez que as concentrações responsáveis pela morte de 50 por cento das células cancerosas é menor do que a concentração que causa a morte da mesma taxa de células normais.

## REFERÊNCIAS

- Adams RP (2007) **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Aydin E, Türkez H, Taşdemir S (2013) **Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells**. Arh Hig Rada Toksikol. 64: 415-425. 10.2478/10004-1254-64-2013-2365.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) **Biological effects of essential oils - A review**. Food Chem Toxicol 46:446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Barros DB, Nascimento NS, Sousa AP, Barros AV, Borges YWB et al. (2023) **Antifungal activity of terpenes isolated from the Brazilian Caatinga: a review**, Braz J. Biol., 83, <https://doi.org/10.1590/1519-6984.270966>
- Biswas R, Mandal SK, Dutta S, et al (2011) **Thujone-Rich Fraction of Thuja occidentalis Demonstrates Major Anti-Cancer Potentials : Evidences from In Vitro Studies on A375 Cells**. Evidence-based Complement Altern Med 2011:1–16.

<https://doi.org/10.1093/ecam/nej042>

Blowman K, Magalhães M, Lemos MFL, et al (2018) **Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products**. Evidence-based Complement Altern Med 2018:.  
<https://doi.org/10.1155/2018/3149362>

Botrel PP, Pinto JEBP, Ferraz V, et al (2010) **Teor e composição química do óleo essencial de Hyptis marrubioides Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade**. Acta Sci - Agron 32:533–538. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.3415>

Brandão HN, Medrado HHS, David JP, et al (2016) **Determination of podophyllotoxin and related ariltetralin lignans by HPLC/DAD/MS from Lamiaceae species**. Microchem J. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.09.002>

Bridi H, Meirelles GDC, Poser GL Von (2021) **Subtribe Hyptidinae ( Lamiaceae ): A promising source of bioactive metabolites**. J Ethnopharmacol 264:113225.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113225>

Camargo KC, Batista LR, Alves E, et al (2019) **Antibacterial action of the essential oil from Cantinoa carpinifolia benth . Against Escherichia coli and Staphylococcus aureus strains**. 1–8. <https://doi.org/10.1002/ffj.3541>

Chen W, Lu Y, Chen G, Huang S (2013) **Molecular Evidence of Cryptotanshinone for Treatment and Prevention of Human Cancer**, Anti-Cancer Agents Med. Chem. 13: 979-987. [10.2174/18715206113139990115](https://doi.org/10.2174/18715206113139990115)

Costa IF de JB, Simão TLBV, Calixto SD, et al (2021) **Anti-mycobacterial and immunomodulatory activity of n -hexane fraction and spathulenol from Ocotea notata leaves**. Rodriguésia 72:1–14

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) **Natural Products (Secondary Metabolites)**. Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 24, 1250-1319

David JP, Silva EF, Moura DL De, et al (2001) **Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de Eriope blanchetii**. Quim Nov 24:730–733

de Figueirêdo FRSDN, Primo AJB, Monteiro áLefe B, et al (2018b) **Avaliação da atividade moduladora e citotóxica do óleo essencial das folhas de Hyptis martiusii Benth**. Rev Cienc Salud 16:49–58. <https://doi.org/10.12804/revistas.urosario.edu.co/revsalud/a.6489>

de Sá S, Fiuza TS, Borges LL, Ferreira HD, Tresvenzol LMF, Ferri PH, Rezende MH, Paula JR, **Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of Hyptis carpinifolia**. Rev. bras. farmacogn. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.011>

Gao W, Liang H, Li Y, et al (2019) **Root extract of Prunella vulgaris inhibits in vitro and in vivo carcinogenesis in MCF-5 human breast carcinoma cells via suppression of angiogenesis , induction of apoptosis , cell cycle arrest and modulation of PI3K / AKT signalling pathway**. JBUON 24:549–554

Gordaliza M, García PA, Miguel del Corral MA, et al (2004) **Podophyllotoxin : distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives**. Toxicon 44:441–459.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.008>

Gowda PJ, Ramakrishnaiah H, Krishna V, et al (2012) **Caryophyllene-Rich Essential Oil of *Didymocarpus tomentosa*: Chemical Composition and Cytotoxic Activity**. *Nat Prod Commun* 7:1535–1538. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701131>

Harley RM, Pastore JFB (2012) **A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence**. *Phytotaxa* 58:1–55. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.58.1.1>

Kingston DGI, RMM, ZW V. (1977) **Plant anticancer agents. Constituents of *Hyptis tomentosa***. *J Pharm Sci* 66:496–499

Lee J-Y, Park H, Lim W, Song G (2020) **Therapeutic potential of  $\alpha$ ,  $\beta$  - thujone through metabolic reprogramming and caspase - dependent apoptosis in ovarian cancer cells**. *J Cell Physiol* 1–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.30086>

Legault J, Pichette A (2007) **Potentiating effect of b -caryophyllene on anticancer activity of a -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel**. *J Pharm Pharmacol* 59:1643–1647. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.12.0005>

Ma W, Liu X, Du W (2019) **Baicalin induces apoptosis in SW480 cells through downregulation of the SP1 transcription factor**. *Anticancer Drugs* 30:153–158. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000708>

Medrado HHS, David JM, David JP, Brandão HN (2015) **Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados**. *Quim Nov* 38:243–258

Mosmann T (1983) **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays**. *J Immunol Methods* 65:55–63

Mota M, Pastore JFB, Neto RM, Salimena FR (2020) **Lamiaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil**. *Rodriguésia* 71:1–10

Németh ÉZ, Nguyen HT (2020) **Thujone, a widely debated volatile compound: What do we know about it ?** *Phytochem Rev*. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09671-y>

Nunes CR, Valente PM, da Silva FD, Valente VMM (2021) **Chemical composition and antifungal activity of *Thymus Vulgaris* essential oil on *Aspergillus Niger*, *Penicillium Expansum*, *Sclerotinia Sclerotiorum* and *Sclerotium Rolfsii***. *Brazilian J Dev* 7:14250–14260. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-173>

Pereira LCO (2014) **Caracterização química de óleos essenciais de quatro espécies da família Lamiaceae : *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, *Hyptis pectinata* (L.) Poit, *Hyptis martiusii* Benth. e *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer**. TCC UFPB, João Pessoa. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/893>

Pichersky E, Noel JP, Dudareva N (2006) **Biosynthesis of Plant Volatiles : Nature ' s Diversity and Ingenuity**. *Plant Volatiles Sci* 311:808–811

Pinheiro MA, Magalhães RM, Torres DM, et al (2015) **Gastroprotective effect of alpha -**

**pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from Hyptis species.** Pharmacogn Mag | 11:123–130. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.149725>

Raffaeuf RF, Kelley CJ, Ahmad Y, Le Quesne PW (1986) **a- and b-peltatin from eriope macrostachya.** Journal Nat Prod 50:772–773

Sá S, Fiuza TS, Borges LL, et al (2016) **Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of Hyptis carpinifolia.** Rev Bras Farmacogn. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.011>

Santos EO, Lima LS, David JM, et al (2011) **Podophyllotoxin and other aryltetralin lignans from Eriope latifolia and Eriope blanchetii.** Nat Prod Res Former Nat Prod Lett 25:1450–1453

Santos LKB, Veras MDA, Marques KKG, et al (2020) **Assessment of In Vitro Anti-melanoma Potential of Ephedranthus pisocarpus R.E.Fr.** Anticancer Res 40:5015–5024. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14504>

Scharf DR, Simionatto EL, Carvalho JE, et al (2016) **Chemical Composition and Cytotoxic Activity of the Essential Oils of Cantinoa stricta ( Benth .) Harley & J . F . B . Pastore ( Lamiaceae ).** Rec Nat Prod 10:257–261

Sedano-Partida MD, dos Santos KP, Sala-carvalho WR, et al (2020) **Anti-HIV-1 and antibacterial potential of Hyptis radicans (Pohl) Harley & J.F.B. Pastore and Hyptis multibracteata Benth. (Lamiaceae).** J Herb Med 20:. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100328>

Shakeri A, D’Urso G, Taghizadeh SF, et al (2019) **LC-ESI / LTQOrbitrap / MS / MS and GC – MS profiling of Stachys parviflora L . and evaluation of its biological activities.** J Pharm Biomed Anal 168:209–216. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.02.018>

Suffness M, Pezzuto JM. **Assays related to cancer drug discovery.** In: Hostettmann K, editor. **Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity.** London: Academic Press; 1990. pp. 71–133

Takshak S, Agrawal SB (2019) **Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress,** J. Photochem. Photobiol., B, 193: 51-88, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002>

Teixeira ML, Cardoso MG, Ferreira VRF, Campolina GA, Caetano ARS, Oliveira CD, Alves MVP, Nelson DL (2023) **Evaluation of the antioxidant activity of the essential oils from Cantinoa carpinifolia (Benth.) and Lippia organoides (Kunth.) by various methods.** Journal of Essential oil research. 35: 143-153. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2115570>

Twaij BM, Hasan MN (2022) **Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses,** Int. J. Plant Biol, 13:4–14. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>

Urban AM, Nadal J, Swiech D, et al (2021) **Cantinoa althaeifolia essential oil : chemical composition and biological , antioxidant , antimicrobial , and antitumor activities.** Res Soc Dev 10:1–14

Wang R-L, Gao Y, Zing X (2020) **Analysis of Chemical Composition and Assessment of Antioxidant, Cytotoxic and Synergistic Antibacterial Activities of Essential Oils from Different Plant Parts of *Piper boehmeriifolium***. Chem Biodivers 17:.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.202000245>

Xie F, Rizvi SAH, Zeng X (2019) **Fumigant toxicity and biochemical properties of ( $\alpha + \beta$ ) thujone and 1, 8-cineole derived from *Seriphidium brevifolium* volatile oil against the red imported fire ants *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)**. Rev Bras Farmacogn 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.04.013>

Yamagishi T, Zhang D-C, Chang J-J, et al (1988) **The cytotoxic principles of *hyptis capitata* and the structures of the new triterpenes hyptatic acid-a and -b\***. Phytochemistry 27:3213–3216

Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, Formelli F. (2002) **Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines but not on normal cells**. Cancer Lett, 175, 17–25, [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00718-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00718-2)

## APÊNDICE A

Tabela 1 – Concentração inibitória de 10% (IC<sub>10</sub>) e 90% (IC<sub>90</sub>) (µg mL<sup>-1</sup>) das células e índice de seletividade (IS) dos extratos SPE e SPS e dos ácidos oleico (Á.O.) e palmítico (Á.P.)

Tratamentos		MELAN-A	B16F10	4T1	VERO	SW480	IS (MELAN-A/ B16F10)	IS (MELAN-A/ 4T1)	IS (VERO/SW480)
SPE	IC <sub>10</sub>	321,68	18,56	3606	13,39	31,32	17,33	0,09	0,42
	Log IC <sub>10</sub>	2,50	1,26	3,55	1,12	1,49			
	IC <sub>90</sub>	545,21	12511	-	388241	1393	0,04	-	278,70
	Log IC <sub>90</sub>	2,73	4,09	-	5,58	3,14			
SPS	IC <sub>10</sub>	157,69	12,84	-	12,94	86,35	12,28	-	0,14
	Log IC <sub>10</sub>	2,19	1,10	-	1,11	1,93			
	IC <sub>90</sub>	1276,98	2245,53	-	569846	1323	0,56	-	430
	Log IC <sub>90</sub>	3,10	3,35	-	5,75	3,12			
Á.O.	IC <sub>10</sub>	18,31	36,57	68,12	112,68	229,70	0,50	0,26	0,49
	Log IC <sub>10</sub>	1,26	1,56	1,83	2,05	2,36			
	IC <sub>90</sub>	1378,13	10984	181,43	141,95	283,68	0,12	7,59	0,50
	Log IC <sub>90</sub>	3,13	4,04	2,25	2,15	2,45			
Á.P.	IC <sub>10</sub>	5,08	486,54	0,69	2,89	30,76	0,01	7,36	0,09
	Log IC <sub>10</sub>	0,70	2,68	-0,15	0,46	1,48			
	IC <sub>90</sub>	244,19	623,56	369,69	317,55	209,83	0,39	0,66	1,51
	Log IC <sub>90</sub>	2,38	2,79	2,56	2,50	2,32			

SPE: Extrato da semente de *Passiflora edulis*; SPS: Extrato da semente de *Passiflora setacea*; Á.O.: Ácido oleico; Á.P.: Ácido palmítico; MELAN-A: célula normal murina; B16F10: célula de melanoma murina; 4T1: célula de câncer de mama murino; VERO: célula normal primata; SW480: célula câncer colorretal human; -: valor não calculado pelo Prism. Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 2 – Concentração inibitória de 10% (IC<sub>10</sub>) e de 90% (IC<sub>90</sub>) (µg mL<sup>-1</sup>) das células murinas e índice de seletividade (IS) dos óleos essenciais de Lamiaceae do Cerrado

Óleos essenciais		MELAN-A	B16F10	4T1	IS (MELAN-A/ B16F10)	IS (MELAN-A/ 4T1)
CR Folhas e flores	IC <sub>10</sub>	14,26	43,42	33,11	0,32	0,43
	Log IC <sub>10</sub>	1,15	1,63	1,52		
	IC <sub>90</sub>	174,47	136,24	60,80	1,28	2,86
	Log IC <sub>90</sub>	2,24	2,13	1,78		
CC Flores	IC <sub>10</sub>	4,69	8,78	87,78	0,53	0,05
	Log IC <sub>10</sub>	0,67	0,94	1,94		
	IC <sub>90</sub>	622,43	4450,25	483,70	0,13	1,28
	Log IC <sub>90</sub>	2,79	3,64	2,68		
CC Folhas	IC <sub>10</sub>	13,75	14,14	74,32	0,97	0,18
	Log IC <sub>10</sub>	1,13	1,15	1,87		
	IC <sub>90</sub>	533,99	2687,78	427,43	0,19	1,24
	Log IC <sub>90</sub>	2,72	3,42	2,63		

CR: *Cyanocephalus rugosus*; CC: *Cantinoa carpinifolia*; melan-a: célula normal murina; B16F10: célula de melanoma murina; 4T1: célula de câncer de mama murino. Autoria própria (2023).

Tabela 3 – Concentração inibitória de 10% (IC<sub>10</sub>) e de 90% (IC<sub>90</sub>) (µg mL<sup>-1</sup>) das células humanas e índice de seletividade (IS) dos óleos essenciais de Lamiaceae do Cerrado

Óleos essenciais		VERO	SW480	HEPG-2	IS (VERO/ SW480)	IS (VERO/ HEPG-2)
CR Folhas e flores	IC <sub>10</sub>	58,16	29,81	11,30	1,95	5,14
	Log IC <sub>10</sub>	1,76	1,47	1,05		
	IC <sub>90</sub>	302,92	165,04	69,63	1,83	4,35
	Log IC <sub>90</sub>	2,48	2,21	1,84		
CR Folhas	IC <sub>10</sub>	34,78	16,20	14,54	2,14	2,39
	Log IC <sub>10</sub>	1,54	1,20	1,16		
	IC <sub>90</sub>	108,28	110,23	100,73	0,98	1,07
	Log IC <sub>90</sub>	2,03	2,04	2,00		
CC Flores	IC <sub>10</sub>	76,06	43,97	49,19	1,72	1,54
	Log IC <sub>10</sub>	1,88	1,64	1,69		
	IC <sub>90</sub>	674,22	147,50	248,95	4,57	2,70
	Log IC <sub>90</sub>	2,82	2,16	2,39		
CC Folhas	IC <sub>10</sub>	62,86	28,54	68,49	2,20	0,91
	Log IC <sub>10</sub>	1,79	1,45	1,83		
	IC <sub>90</sub>	366,11	483,56	315,01	0,75	1,16
	Log IC <sub>90</sub>	2,56	2,68	2,49		

CR: *Cyanocephalus rugosus*; CC: *Cantinoa carpinifolia*; VERO: Epitélio de rim normal de macaco verde africano; SW480: Câncer colorretal humano; HEPG-2: Câncer de fígado humano. Autoria própria (2023).