

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Do bioativo natural ao modelo avançado: explorando óleos essenciais e culturas 3D para novas terapias anticâncer

Franciele Filardi Cimino Silva
Doctor Scientiae

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025

FRANCIELE FILARDI CIMINO SILVA

Do bioativo natural ao modelo avançado: explorando óleos essenciais e culturas 3D para novas terapias anticâncer

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: Anesia A. dos Santos

Coorientadora: Vania M. Moreira Valente

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

S586d
2025

Silva, Franciele Filardi Cimino, 1997-

Do bioativo natural ao modelo avançado: explorando óleos essenciais e culturas 3D para novas terapias anticâncer / Franciele Filardi Cimino Silva. – Viçosa, MG, 2025.

1 tese eletrônica (113 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Anésia Aparecida dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.782>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Câncer - Tratamento - Efeito das essências e óleos essenciais. 2. Imagem tridimensional em medicina. 3. Citologia. 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. 615.321

FRANCIELE FILARDI CIMINO SILVA

Do bioativo natural ao modelo avançado: explorando óleos essenciais e culturas 3D para novas terapias anticâncer

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: 28 de outubro de 2025.

Assentimento:

Franciele Filardi Cimino Silva
Autora

Anesia Aparecida dos Santos
Orientadora

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 27/11/2025 às 19:55:09 e pela orientadora em 28/11/2025 às 10:25:57. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **8EZ2.2HFK.7K5S** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

SILVA, Franciele Filardi Cimino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2025. **Do bioativo natural ao modelo avançado: explorando óleos essenciais e culturas 3D para novas terapias anticâncer.** Orientadora: Anesia Aparecida dos Santos. Coorientadora: Vania Maria Moreira Valente.

O tratamento do câncer enfrenta o duplo desafio de encontrar agentes terapêuticos seletivos e desenvolver modelos pré-clínicos fidedignos para prever a resposta clínica. Esta tese abordou ambos os desafios através de três eixos de pesquisa. O primeiro investigou o potencial de produtos naturais, revelando um perfil de atividade distinto para cada óleo essencial (OE) testado: enquanto o OE de canela (rico em fenilpropanoides) destacou-se pela alta atividade citotóxica, o OE de camomila (rico em sesquiterpenos) e o OE de noz-moscada (rico em monoterpenos) exibiram notável seletividade, respectivamente, contra células de hepatocarcinoma (IS > 77) e células de câncer de mama (IS > 13). O segundo eixo se propôs a superar as limitações metodológicas encontradas nos modelos celulares bidimensionais (2D) por meio da padronização de um modelo de esferoide celular tridimensional (3D) cultivado em substrato de rigidez controlada. O modelo 3D foi crucial para revelar que o provável mecanismo antitumoral dos OEs é a desestabilização da arquitetura do agregado via quebra da adesão célula-célula, e não apenas a citotoxicidade direta. Finalmente, o último eixo da pesquisa foi o desenvolvimento de uma plataforma *ex vivo* de explantes tumorais vascularizados para o adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), que permitiu diferenciar mecanismos de resistência a quimioterápicos, como a fuga proliferativa, validando seu potencial como ferramenta preditiva para a medicina de precisão. Em conjunto, este trabalho avança desde a prospecção de agentes bioativos até a criação de modelos preditivos complexos, contribuindo com novas ferramentas para a oncologia translacional.

Palavras-chave:

câncer; óleos essenciais; cultura de células 3D

ABSTRACT

SILVA, Franciele Filardi Cimino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2025. **From natural bioactive to advanced model: exploring essential oils and 3D cultures for new anticancer therapies.** Adviser: Anesia Aparecida dos Santos. Co-adviser: Vania Maria Moreira Valente.

Cancer treatment faces the dual challenge of finding selective therapeutic agents and developing reliable preclinical models to predict clinical response. This thesis addressed both challenges through three research axes. The first investigated the potential of natural products, revealing a distinct activity profile for each essential oil (EO) tested: while cinnamon EO (rich in phenylpropanoids) stood out for its high cytotoxic activity, chamomile EO (rich in sesquiterpenes) and nutmeg EO (rich in monoterpenes) exhibited remarkable selectivity against hepatocellular carcinoma cells (IS > 77) and breast cancer cells (IS > 13), respectively. The second axis aimed to overcome the methodological limitations found in two-dimensional (2D) cell models through the standardization of a three-dimensional (3D) cellular spheroid model cultivated on a substrate of controlled rigidity. The 3D model was crucial in revealing that the likely antitumor mechanism of the OEs is the destabilization of the aggregate architecture via disruption of cell-cell adhesion, and not just direct cytotoxicity. Finally, the last axis of the research was the development of an *ex vivo* platform of vascularized tumor explants for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which allowed the differentiation of chemotherapy resistance mechanisms, such as proliferative escape, validating its potential as a predictive tool for precision medicine. Taken together, this work advances from the prospecting of bioactive agents to the creation of complex predictive models, contributing new tools to translational oncology.

Keywords:

cancer; essential oils; 3D cell culture

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
REFERÊNCIAS.....	12
CAPÍTULO 1.....	13
ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Matricaria chamomilla</i>, <i>Myristica fragrans</i>, <i>Cinnamomum cassia</i> e <i>Cinnamomum zeylanicum</i> NAS LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR, COLORRETAL E MAMÁRIO.....	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Cultivo Celular	24
3.2. Material Vegetal e Preparo dos OEs.....	24
3.2.1. Análise química dos OEs	25
3.3. Ensaio de Citotoxicidade <i>In Vitro</i>	26
3.4. Ensaio de Apoptose	29
3.5. Avaliação do Ciclo Celular.....	31
3.6. Análise Estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Composição dos OEs.....	33
4.2. Citotoxicidade	37
4.2.1. Índice de Seletividade dos Compostos (IS)	46
4.3. Avaliação de morte celular	47
4.4. Análise do ciclo celular	53
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO 2.....	73
CULTURA DE CÉLULAS 3D: OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO E ANÁLISE DE ESFEROIDES TUMORAIS	73
1. INTRODUÇÃO	73
2. OBJETIVOS	76
2.1. Objetivo Geral	76
2.2. Objetivos Específicos.....	76

3. MATERIAL E MÉTODOS	77
3.1. Linhagem Celular e Condições de Cultivo Padrão	77
3.2. Caracterização Viscoelástica dos Hidrogéis de Agarose	77
3.3. Otimização do Protocolo para Formação de Esferoides 3D	78
3.3.1. Preparo das Placas com Hidrogel de Agarose	78
3.3.2. Semeadura das células HepG2	78
3.3.3. Cinética de Formação de Esferoides	79
3.3.4. Avaliação da Citotoxicidade dos OEs em Modelo 3D	79
3.4. Análise Estatística	80
4. RESULTADOS	81
4.1. Caracterização Viscoelástica dos Hidrogéis de Agarose como Substrato para Cultura 3D	81
4.2. Padronização do Protocolo de Formação de Esferoides de HepG2 ...	82
4.3. Análise da Citotoxicidade dos OEs no Modelo de Esferoides 3D	84
4.3.1. Efeito dos OEs na Morfologia e Integridade dos Esferoides	84
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÃO	94
7. REFERÊNCIAS	95
CHAPTER 3	97
VASCULARIZED TUMOR EXPLANTS	97
1. INTRODUCTION	97
2. OBJECTIVES	99
2.1. General Objective	99
2.2. Specific Objectives	99
3. MATERIAL AND METHODS	100
3.1. Vascular Network Formation	100
3.2. SMC Immortalization	100
3.3. PDAC Spheroid Culture	101
3.4. Immunofluorescence Staining	101
3.5. Patient-Derived Xenograft (PDX) Model	102
3.6. Viability assay	102
4. RESULTS	103
4.1. Optimization and Characterization of the Vascularized Tumor Explant (VTE) Platform	103
4.2. VTE Platform Distinguishes Drug Response in PDAC Spheroid Models	

4.3. Response of Patient-Derived Xenograft (PDX) Explants to Gemcitabine	107
5. DISCUSSION	109
6. REFERENCES	111
CONCLUSÃO GERAL.....	112

INTRODUÇÃO GERAL

Câncer é um grande grupo de doenças que podem começar a se desenvolver em quase todos os órgãos do corpo. Essas doenças são caracterizadas pela proliferação incontrolável de células anormais, que adquirem a capacidade de extravasar do tecido de origem e invadir tecidos adjacentes. O processo em que as células malignas se espalham para outros órgãos é chamado de metástase, a qual é uma das principais causas de morte por câncer (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável no ano de 2018 por cerca de 9,6 milhões de mortes. Isso quer dizer que 1 em cada 6 mortes que ocorrem ao redor do mundo são causadas pelo câncer. O câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e carcinoma hepatocelular são os tipos mais comuns de câncer nos homens, enquanto o câncer da mama, colorretal, pulmonar, cervical e de tireoide são os tipos mais comuns entre as mulheres (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022).

Estima-se que os casos de câncer ao redor do mundo aumentarão em 75% até 2050 (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2019), e fatores como: poluição, envelhecimento, consumo de álcool e tabaco, inflamações e obesidade são os principais responsáveis.

As mudanças pelas quais as células normais do corpo passam para se tornarem malignas são o resultado da interação entre os fatores genéticos de uma pessoa e três categorias de agentes externos: 1) exposição a agentes físicos, tais como radiação ultravioleta e ionizante; 2) exposição a agentes químicos, como o amianto (comumente encontrado em telhas, peças automotivas e caixas d'água), componentes do fumo do tabaco, aflatoxina (um contaminante alimentar) e arsênio (um contaminante da água potável); e 3) exposição a agentes biológicos, como infecções por certos vírus, bactérias ou parasitos tais como hepatite e papilomavírus humano (HPV) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022).

Introdução Geral

O câncer de mama, o carcinoma hepatocelular e o câncer colorretal estão entre os 10 tipos de câncer mais incidentes e mortais a nível mundial, em ambos os sexos (FERLAY *et al.*, 2024). E por isso, carecem de novas estratégias terapêuticas mais eficazes, que visam o bem-estar do paciente e que sejam de baixo custo.

O uso de produtos naturais para fins terapêuticos é tão antigo quanto a civilização humana e seu estudo é fundamental para a descoberta de novos medicamentos. Óleos essenciais (OEs), são misturas complexas de metabólitos secundários das plantas, e seus compostos bioativos apresentam inúmeras propriedades biológicas e farmacêuticas, incluindo atividade anticancerígena. Evidências demonstram que OEs exercem efeitos citotóxicos, antiproliferativos e antimetastáticos em culturas de células tumorais, seja de forma isolada ou em sinergia com quimioterápicos convencionais, o que os posiciona como uma via promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra o câncer (KOZICS *et al.*, 2025).

Ao longo dos anos, muitas abordagens foram desenvolvidas para sintetizar tumores *in vitro* com o objetivo de analisar a biologia do câncer e identificar medicamentos promissores. Culturas celulares tridimensionais (3D), como os esferoides, são ferramentas valiosas que podem prever com mais veracidade a heterogeneidade do tumor do que a monocamada de células 2D. Mas os esferoides ainda carecem de interações importantes, como por exemplo, células imunes e vasculatura (BAZOU *et al.*, 2016).

Nesse sentido, surge uma alternativa para determinar a eficácia de terapias antitumorais em modelos mais semelhantes ao microambiente tumoral: os explantes tumorais vascularizados, do inglês, “*vascularized tumor explants*” (VTE). Essa plataforma pode ser utilizada para prever terapias personalizadas à pacientes: amostras de biópsias inseridas nos tecidos vascularizados *in vitro* são tratadas com diferentes quimioterápicos e o melhor resultado é selecionado para tratamento adjuvante ou neo-adjuvante.

Essa tese foi dividida em três capítulos. O primeiro está dedicado a estudar a eficácia quimioterápica de quatro OEs em linhagens celulares de câncer de

Introdução Geral

mama, câncer colorretal e carcinoma hepatocelular. O segundo capítulo aborda o desenvolvimento de um protocolo para produção de culturas celulares tridimensionais em forma de esferoides. E o terceiro capítulo, tem como foco principal o desenvolvimento de uma nova abordagem, utilizando modelos de células tridimensionais (3D) inseridas em tecidos vascularizados *in vitro*, e tratadas com quimioterápico comercial para adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC).

REFERÊNCIAS

BAZOU, D.; MAIMON, N., GRUIONU, G.; MUNN, L. L. Self-assembly of vascularized tissue to support tumor explants *in vitro*. **Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro**, (2016). v. 8, n. 12, p. 1301–1311. doi:10.1039/c6ib00108d

FERLAY, J. *et al.* Global Cancer Observatory (GLOBOCAN): **Cancer Today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. (2024). Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today>. Acesso em: 05 de agosto de 2024.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **List of classification by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans**, IARC monographs volumes 1-132. Lyon: IARC, 2019. Disponível em: https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/07/Classifications_by_cancer_site.pdf. Acesso em: 17 ago. 2022.

KOZICS, K., *et al.* Evaluation of Bioactivity of Essential Oils: Cytotoxic/Genotoxic Effects on Colorectal Cancer Cell Lines, Antibacterial Activity, and Survival of Lactic Acid Bacteria. **Molecules**, (2025), v.30, n. 4, p. 890. doi:10.3390/molecules30040890

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Cancer**, 2022. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 02 set. 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Folha Informativa: Câncer**. Brasília, D.F.: OPAS, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em: 18 jul. 2023.

CAPÍTULO 1

ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Matricaria chamomilla*, *Myristica fragrans*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum zeylanicum* NAS LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR, COLORRETAL E MAMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

Embora alguns dos métodos convencionais, como a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia, sejam eficazes no tratamento de alguns tipos de câncer, os mesmos, causam inúmeros efeitos colaterais aos pacientes por serem inespecíficos. Além disso, embora muitos tipos de câncer sejam inicialmente suscetíveis à quimioterapia, com o tempo, as células do tumor podem desenvolver resistência por meio de mutações de DNA ou alterações metabólicas que promovem a inibição e degradação de medicamentos, reduzindo significativamente a eficácia das drogas sintéticas (HOUSMAN *et al.*, 2014). Terapias direcionadas e imunoterapias apresentam apesar de serem mais eficazes, são bastante onerosas (YAHYA *et al.*, 2025). Considerando a falta de abordagens com alta seletividade ao tumor e de baixo custo, o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos naturais é urgentemente necessário.

A natureza tem sido uma farmacêutica inspiradora ao longo da história da humanidade, fornecendo uma vasta gama de compostos bioativos que servem de base para o desenvolvimento de medicamentos. A partir de plantas, animais e microrganismos, diversos fármacos essenciais foram isolados e sintetizados (MATHUR *et al.*, 2017).

Alguns exemplos clássicos de fármacos derivados da pesquisa com produtos naturais incluem: aspirina: derivada do ácido salicílico, encontrado na casca do da árvore *Salix alba* – é um dos medicamentos mais utilizados no mundo para aliviar a dor, febre e inflamação (UGURLUCAN *et al.*, 2012); morfina: obtida do ópio, uma resina extraída da planta *Papaver somniferum* L. – é um potente

analgésico utilizado para o tratamento de dores intensas, especialmente em casos de câncer (CRAGG *et al.*, 2001); penicilina: descoberta por Alexander Fleming em um bolor de *penicillium* – foi o primeiro antibiótico a ser utilizado em larga escala, revolucionando o tratamento de infecções bacterianas (GAYNES, 2017); taxol: isolado da casca da árvore *Taxus brevifolia* – é um fármaco quimioterápico (paclitaxel) utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, como câncer de ovário e câncer de mama (YANG *et al.*, 2020); artemisinina: extraída da planta *Artemisia annua* – é um fármaco antimalárico altamente eficaz, especialmente contra formas resistentes do parasita da malária (KATIYAR *et al.*, 2012); vincristina e vinblastina: obtidas da planta *Vinca rósea* – são fármacos quimioterápicos utilizados no tratamento de leucemias e linfomas (NOBLE, 1990).

A descoberta de produtos naturais bioativos à base de plantas representa um marco na história dos cuidados de saúde. A extração de metabólitos secundários vegetais, como os OEs, pode ser feita por meio de processos como destilação a vapor ou hidrodestilação (SHARMA *et al.*, 2022). Os OEs são uma mistura complexa de vários compostos químicos, caracterizados principalmente pela volatilidade, aroma, baixo peso molecular e densidade <1 – como a densidade da água é aproximadamente 1 g/cm^3 (ou 1 g/mL), os OEs são menos densos que a água (por isso flutuam) (ISHFAQ *et al.*, 2018).

Os metabólitos secundários, cuja biossíntese representa uma resposta adaptativa da planta a estresses (KHAN *et al.*, 2025), dividem-se em classes principais com distintas origens. Os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15) são as principais subclasses de terpenos, compostos orgânicos voláteis e lipofílicos derivados da via do isopreno (MVA/MEP). Os fenilpropanoides, por sua vez, são compostos aromáticos (estrutura C6-C3) derivados da via do chiquimato/PAL, tendo o cinamaldeído e o eugenol como exemplos clássicos (DE SOUSA *et al.*, 2023). Na planta, essas classes são cruciais para a defesa: os terpenos atuam como toxinas diretas e sinalizadoras, enquanto os fenilpropanoides conferem defesa estrutural (lignina) e química contra patógenos e radiação UV (ALUM *et al.*, 2025).

A função de defesa ecológica desses compostos é, paradoxalmente, a base de sua vasta aplicação clínica. Até agora, mais de 3000 OEs foram descritos, dos quais cerca de um décimo são relevantes para as indústrias farmacêutica, nutricional ou cosmética (SHARIFI-RAD *et al.*, 2017). A importância terapêutica dessas classes reside em sua ampla bioatividade (anti-inflamatória, antioxidante) e, no contexto oncológico, na capacidade de modular múltiplas vias de sinalização celular (ALUM *et al.*, 2025). A mesma lipofilia que os terpenos usam na defesa facilita, na clínica, a travessia de membranas celulares para induzir apoptose, como demonstrado pelo β -cariofileno em linhagens celulares de câncer de pulmão (A549) (SHABANA *et al.*, 2023).

Apesar dos benefícios, o uso de OEs na indústria enfrenta alguns desafios. Um deles, é que a instabilidade química, assim como a biodisponibilidade dos compostos bioativos dos OEs e extratos vegetais pode variar de acordo com fatores como espécie vegetal, local de cultivo e método de extração, dificultando assim a padronização desses produtos (SADGROVE *et al.* 2022).

Através de técnicas analíticas como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), é possível identificar os componentes químicos presentes em um OE e avaliar seu potencial biológico (STASHENKO *et al.* 2017). Assim, os compostos de interesse podem ser isolados e purificados para serem estudados individualmente.

Ao serem isolados e purificados, os compostos bioativos dos OEs podem ser utilizados em testes *in vitro* e *in vivo* para avaliação de seu mecanismo de ação no interior das células bem como da sua toxicidade (CHAACHOUAY *et al.*, 2024). Tecnologias de encapsulamento, como por exemplo, carreadores lipossomais, podem ser utilizadas para superar as limitações intrínsecas dos OEs – como volatilidade, baixa solubilidade em água e sensibilidade à degradação por luz, calor e oxigênio (SHERRY *et al.*, 2013). A suspensão lipossomal pode ser convertida em pó por liofilização e misturada a excipientes, abrindo perspectivas promissoras para a formulação de comprimidos. Vislumbra-se que, no futuro, a indústria farmacêutica possa empregar essa tecnologia para fabricar novos fármacos (NAVEEN & KANDASAMY, 2022).

Os OEs se destacam por possuírem aspectos farmacológicos bastante versáteis como, por exemplo, atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antidiabéticas. Ademais, inúmeros estudos comprovam que os OE são promissores quimioterápicos naturais (BHALLA *et al.*, 2013; LESGARDS *et al.*, 2014; FITSIOU & PAPPA, 2019).

Isso se deve ao fato de que muitos OEs estudados até o momento, são altamente citotóxicos: eles podem induzir a morte celular programada de células cancerígenas por meio de apoptose, necrose, parada do ciclo celular e disfunção das principais organelas celulares. Isso é coordenado por um aumento na fluidez da membrana da célula afetada, redução da geração ATP, alteração no gradiente de pH e perda do potencial mitocondrial (SHARIFI-RAD *et al.*, 2017). Além disso, os OEs podem apresentar efeito antimutagênico, antiproliferativo, antimetastático e antiangiogênico nas células tumorais (BAYALA *et al.*, 2014).

Com base na literatura, selecionamos quatro espécies de plantas para este estudo. O critério de escolha foi a predominância de uma das três principais classes de compostos em seus OEs: sesquiterpenos (*Matricaria chamomila* L.), monoterpenos (*Myristica fragrans* Houtt.) e fenilpropanoides (*Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum zeylanicum*). Apesar do OE dessas espécies já possuírem ampla atividade antitumoral descrita na literatura, ainda são escassos ou inexistentes os estudos que investigam o potencial citotóxico dos mesmos, especificamente contra as linhagens celulares HepG2, SW480 e MCF-7. Dessa forma, este estudo se justifica pela necessidade de preencher essa lacuna, avaliando o potencial terapêutico desses OEs nos modelos *in vitro* selecionados.

A primeira das classes químicas abordadas neste estudo, a dos sesquiterpenos, é predominantemente encontrada na composição do OE de *Matricaria chamomila* L. (Asteraceae). Popularmente conhecida como camomila, (FIGURA 1), é uma planta anual nativa de regiões temperadas da Ásia e da Europa, medindo de 10 a 80 cm de altura. Possui folhas longas e pequenas flores brancas com miolo amarelo, semelhantes às margaridas (DAI *et al.*, 2022).

Figura 1 – *Matricaria chamomilla* L.



Diferentes partes e hábito de *Matricaria chamomilla* L. (camomila-alemã). (A) planta em floração; (B) capítulo; (C) flor do raio; (D) flor do disco; (E) corte longitudinal do capítulo; (F) lobos da corola da flor do disco; (G) anteras; (H) estigma; (I) cipsela (fruto); (J) capítulos florais frescos.

Fonte: CHAUHAN *et al.* (2022).

O OE de camomila é um líquido aromático de cor azul intensa provinda de azulenos (camazuleno), obtido por hidrodestilação dos capítulos florais da planta (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2010). Devido aos seus efeitos benéficos, é amplamente utilizado como aditivo de banho para inflamações da pele, em produtos para higiene oral e maquiagens ou shampoos (ZENGIN *et al.*, 2023).

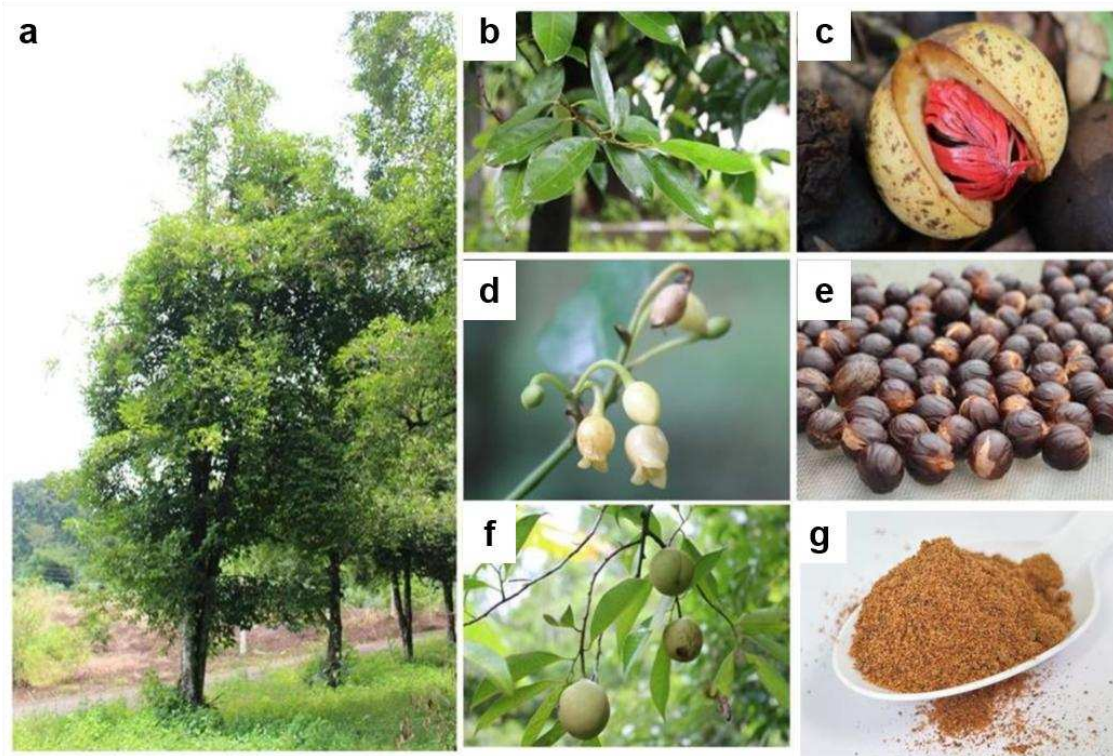
Além das propriedades analgésicas, antialérgicas, antiespasmódicas, antibacterianas e anti-inflamatórias da camomila, essa planta medicinal é também considerada um indutor do sono e um tranquilizante suave (SHINOMIYA *et al.*, 2005). Além disso, alguns estudos sugerem que os extratos de camomila possuem propriedades hipoglicêmicas (KATO *et al.*, 2008), hepatoprotetoras (GUPTA & MISRA, 2006), antioxidantes (CVETANOVIĆ *et al.*, 2015) e efeitos antitumorais contra câncer de próstata, mama, ovário e colorretal (SRIVASTAVA & GUPTA, 2007; AL-DABBAGH *et al.*, 2019; SHEBBO *et al.*, 2020; JOUMAA *et al.*, 2020).

O OE de *Matricaria chamomila* L. e seus constituintes bioativos, com destaque para o flavonoide apigenina, têm seu potencial antineoplásico consistentemente validado em investigações recentes. A literatura demonstra que a apigenina exerce potentes efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em um vasto espectro de linhagens tumorais, incluindo as de câncer colorretal, de mama, pâncreas e glioblastoma, através da modulação de vias de sinalização cruciais como a PI3K/Akt e a MAPK (DANESHVAR *et al.*, 2023). Além do controle sobre a viabilidade celular, a apigenina demonstra uma potente ação antimetastática: estudos recentes evidenciam sua capacidade de suprimir a migração e a invasão celular ao inibir vias como a Wnt/ β -catenina e regular negativamente a expressão de metaloproteinases. (NAPONELLI *et al.*, 2024). Adicionalmente, o composto tem sido apontado como um agente promissor no combate à quimiorresistência e na atuação sobre células-tronco tumorais (OU *et al.*, 2024).

Myristica fragrans Houtt. (Myristicaceae) foi a espécie selecionada como representante da segunda principal classe fitoquímica investigada: a dos monoterpenos. Conhecida popularmente como noz-moscada (FIGURA 2), trata-se de uma árvore perene aromática nativa da Indonésia, que atinge de 10 a 20

metros de altura e possui galhos espalhados e frutos carnudos amarelos. Seu uso como condimento natural na cozinha remonta a séculos (ZHAO *et al.*, 2020).

Figura 2 – *Myristica fragrans* Houtt.



Aspectos morfológicos e produtos derivados de *M. fragrans* Houtt: (A) hábito da planta; (B) folhas; (C) fruto maduro aberto, exibindo a semente coberta pelo arilo; (D) flores; (E) semente (noz-moscada); (F) frutos; (G) produto processado: noz-moscada moída.

Fonte: Adaptado de KHAMNUAN *et al.* (2023).

O OE de noz-moscada, normalmente extraído por destilação a vapor de sementes moídas de *Myristica fragrans*, é conhecido por suas propriedades antitrombóticas, antimicrobianas, antioxidantes e antitumorais (CHATTERJEE *et al.*, 2007; GINTING *et al.*, 2021).

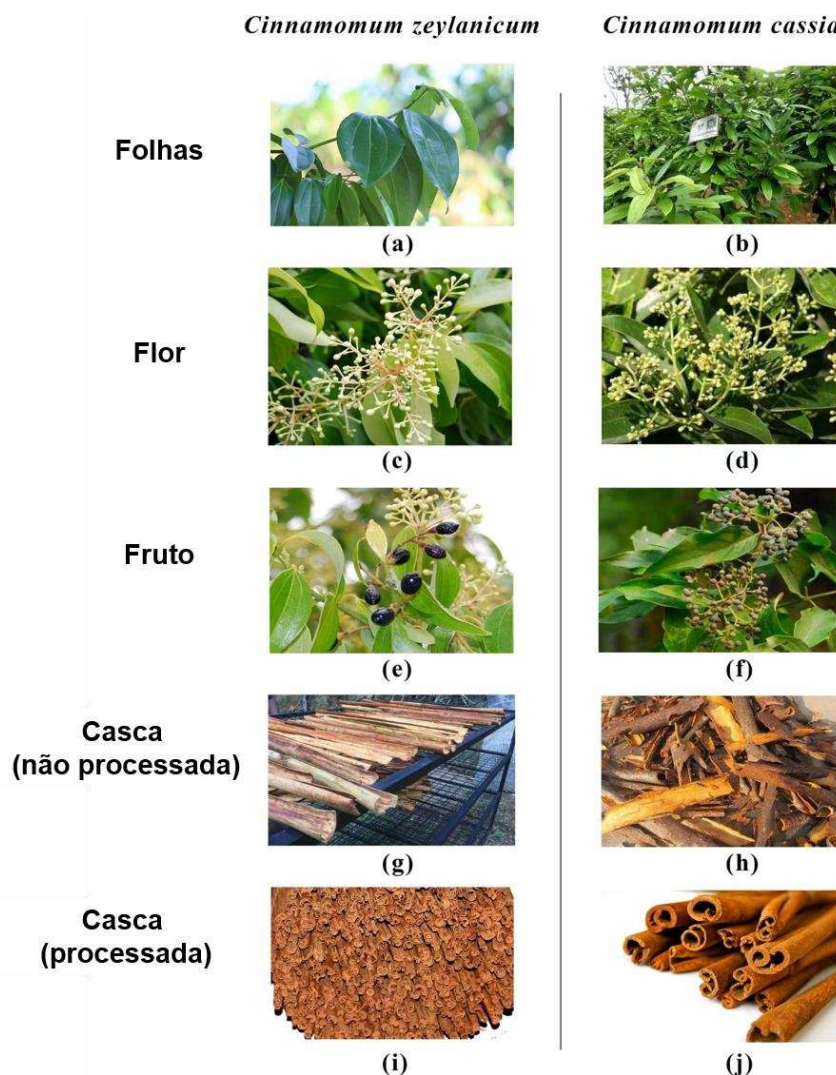
A noz-moscada mostra eficácia terapêutica em distúrbios gastrointestinais e é um agente amplamente utilizado para o tratamento de doenças estomacais na China. Nesse contexto, um estudo de Li *et al.* (2015) demonstrou que a suplementação alimentar com o OE de noz-moscada em camundongos preveniu o desenvolvimento de câncer de cólon por meio da modulação da inflamação da microbiota intestinal (LI *et al.*, 2015).

Em outro estudo, Le e colaboradores (2017) demonstraram que o O.E. de noz moscada induziu a apoptose e inibiu a capacidade de formação de colônias em células de câncer de mama (MCF-7). Além disso, a injeção intraperitoneal do O.E. em camundongos suprimiu o crescimento tumoral de células de câncer mamário (4T1). Isso indica o potencial do tratamento com *Myristica fragrans* para a prevenção e o tratamento do câncer de mama (LE *et al.*, 2017).

Em 2021, outro estudo mostrou que a miristicina, principal constituinte do OE de noz-moscada, exerce um efeito terapêutico no carcinoma hepático ao suprimir a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, podendo, portanto, ser usada como um novo medicamento potencial para o tratamento do carcinoma hepático (BAO & MUGE, 2021).

Finalmente, para ilustrar a classe dos fenilpropanoides, foram selecionadas duas espécies do gênero *Cinnamomum*, cuja casca interna dá origem à especiaria popularmente conhecida como canela. Ambas pertencem à família Lauraceae e são árvores perenes de folhas largas, nativas do sul da China. Existem mais de 250 espécies de canela, mas as mais conhecidas e as que iremos estudar são a *Cinnamomum cassia* e a *Cinnamomum zeylanicum* (FIGURA 3) (RAO *et al.*, 2014), principalmente devido às suas atividades anticancerígenas.

Figura 3 – *Cinnamomum cassia* (L.) e *Cinnamomum zeylanicum* (L.)



Comparação morfológica entre *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia*. Folhas (a, b); as inflorescências (c, d); os frutos (e, f); a casca não processada no tronco (g, h) e a casca processada (i, j) de *C. zeylanicum* (painéis à esquerda) e *C. cassia* (painéis à direita), respectivamente. Notam-se as diferenças marcantes nos paus de canela, com *C. zeylanicum* apresentando múltiplas camadas finas em contraste com a casca única e espessa de *C. cassia*.

Fonte: Adaptado de DE SILVA *et al.*, (2021)

O OE dessas duas espécies de canela é rico em cinamaldeído, um composto conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais. Segundo Sadeghi *et al.* (2019), sua ação contra tumores inclui a capacidade de induzir a apoptose (morte celular programada) e inibir a proliferação celular, a metástase e a angiogênese. Essas e outras atividades antitumorais são, de fato, reportadas em inúmeros estudos tanto para o óleo da

canela quanto para seus constituintes isolados. (ALAM *et al.*, 2023; KWON *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; BANERJEE & BANERJEE, 2023; DUTTA *et al.*, 2018).

A literatura reporta que o tratamento com cinamaldeído é capaz de inibir a proliferação celular e induzir a morte por apoptose em linhagens de alta agressividade, como as de câncer de mama triplo-negativo e de carcinoma hepatocelular (LIU *et al.*, 2020; NG & WU, 2011). Adicionalmente, as investigações apontam para mecanismos de ação que vão além da citotoxicidade, incluindo a supressão do potencial metastático através da redução da capacidade de migração e invasão celular. Estudos também demonstram que o óleo de canela pode modular vias importantes para a progressão tumoral, como a inibição da expressão da metaloproteinase-9 (MMP-9) e a indução de estresse oxidativo, o que sugere um amplo espectro de alvos moleculares (ALIYAH *et al.*, 2022).

A análise da literatura demonstra, portanto, que os OEs de *Matricaria chamomila*, *Myristica fragrans* e *Cinnamomum* spp. possuem um robusto potencial anticarcinogênico, embora seus mecanismos de ação possam variar conforme a composição química e o tipo de câncer investigado. A seleção destas quatro espécies vegetais buscou abranger a diversidade das principais classes de compostos bioativos em OEs, e preencher as lacunas no entendimento dos efeitos antitumorais e dos mecanismos moleculares específicos contra linhagens de alta relevância clínica. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química comparativa destes OEs e avaliar sua atividade citotóxica *in vitro*, a fim de fornecer dados científicos que validem seu potencial como fonte para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antitumoral dos OEs de *Matricaria chamomilla*, *Myristica fragrans*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum zeylanicum* nas linhagens celulares de carcinoma hepatocelular (HepG2), câncer colorretal (SW480) e câncer de mama (MCF-7).

2.2. Objetivos Específicos

- a) Realizar a análise química dos principais constituintes dos OEs de *Matricaria chamomilla*, *Myristica fragrans*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum zeylanicum*;
- b) Obter o valor da concentração inibitória de 90% (IC₉₀), 50% (IC₅₀) e 10% (IC₁₀) dos OEs sobre as linhagens não-tumorais VERO e BGM e sobre as linhagens tumorais HepG2, MCF-7 e SW480;
- c) Calcular o Índice de Seletividade (IS) a partir dos valores da IC₅₀;
- d) Determinar se a morte celular causada pelos dos OEs ocorre por necrose ou apoptose;
- e) Avaliar a interferência dos tratamentos dos OEs no ciclo celular das células tratadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo Celular

Linhagens celulares de epitélio normal de rim de macaco – VERO (ATCC CCL-81™) e BGM (CVCL_4125), e as linhagens de adenocarcinoma de cólon humano – SW480 (ATCC CCL-228™), carcinoma hepatocelular humano – HepG2 (ATCC HB-8065™), e adenocarcinoma mamário humano – MCF-7 (ATCC HTB-22™), foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), ampicilina 100U/mL e estreptomicina 0,1mg/mL (todos Sigma Aldrich). Os frascos de cultura de poliestireno de cada linhagem foram mantidos em incubadora (MCO-18AC Panasonic, U.S. Canadá) a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa (condições padrão de cultivo celular). Quando as culturas atingiam a subconfluência, as mesmas eram lavadas em solução PBS-EDTA (2g.L⁻¹) (Sigma-Aldrich) e removidas com solução de tripsina-EDTA (2,5g.L⁻¹) (Sigma-Aldrich), replaqueadas para manutenção e/ou experimentação ou congeladas em N₂ líquido.

3.2. Material Vegetal e Preparo dos OEs

As flores secas de camomila (*Matricaria chamomilla*) – origem: Nacional –, a noz-moscada em bola (*Myristica fragrans*) – origem: Indonésia –, a casca da canela (*Cinnamomum cassia*) – origem: Vietnã – e o óleo pronto da casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) foram adquiridos em mercado local, e o acesso foi registrado com o número A637F5E e AAE0BCD no SisGen. Os OEs 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).

O material vegetal foi triturado com 500mL de água em liquidificador e, transferido para um balão de fundo redondo de 1L que foi acoplado a um aparelho Clevenger. Para o cálculo de rendimento dos OEs, foi utilizado o volume obtido por 100g de material vegetal seco.

As extrações foram realizadas por meio de hidrodestilação. Neste método a mistura (planta e água) é mantida em ebulição constante. No vapor de água

formado há presença dos compostos voláteis e após o processo de condensação é possível observar uma mistura bifásica, onde a camada oleosa pode ser separada por funil de separação ou extração com solventes. O OE obtido foi recolhido em um frasco adequado e armazenado sob refrigeração. Para a extração do óleo de *Matricaria chamomilla* foi necessário o tempo de hidrodestilação de 480 minutos; a massa total extraída foi de 200g e o volume total de óleo obtido foi de 0,5mL. Para a extração do óleo de *Myristica fragrans* e *Cinnamomum cassia* foi necessário o tempo de hidrodestilação de 300 minutos, a massa total extraída foi de 100 e 200g, com volume total de óleo obtido de 7,0 e 6,8mL, respectivamente.

3.2.1. Análise química dos OEs

A caracterização dos OEs foi obtida pela injeção de 1µL da solução em diclorometano, com concentração de 5 mg/mL, injetado através de auto-injetor modelo AOC-20i Shimadzu, temperatura de 220°C; detector com temperatura de 240°C; razão split 1:20 e varredura de fragmentos de 45 a 600 (m/z), em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), modelo Shimadzu QP2010. Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: coluna de sílica fundida (30m x 0,25mm) com fase estacionária RTX5 (0,25 µm de espessura do filme), hélio como gás de arraste com vazão de 1,0mL/min; a temperatura programada do forno inicialmente a 60°C, com incremento de 2°C por minuto até atingir a temperatura de 200°C, seguida de aumento de 5°C por minuto até atingir a temperatura de 280°C (JARDIM *et al.*, 2018).

A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos espectros de massas de cada substância com a espectroteca NIST 05, e os índices aritméticos (IA) calculados foram comparados com a literatura (ADAMS, 2017). O cálculo do percentual relativo de cada componente foi dado através da razão entre a área da integral dos respectivos picos, e a área total de todos os contribuintes da amostra (NUNES *et al.* 2021).

Os IAs foram obtidos pela Equação 1, após injetado uma mistura de padrões de alcanos serie homologa de C7 (heptano) a C30 (tridecano), no cromatógrafo empregando as mesmas condições cromatográficas do OE.

Equação 1:

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

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.

3.3. Ensaio de Citotoxicidade *In Vitro*

A sobrevivência/proliferação celular foi mensurada por meio do ensaio do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Para as linhagens celulares descritas anteriormente, foi avaliada a atividade citotóxica dos OEs de *Matricaria chamomilla*, *Myristica fragrans*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum zeylanicum*, para obtenção da IC₁₀ e IC₅₀ e IC₉₀ dos mesmos. Para tanto, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1x10⁴ células/mL, e cultivadas por 24h sob condições padrão de cultivo celular. Em seguida, as placas foram expostas à diferentes concentrações dos tratamentos, e incubadas por 48 horas. As concentrações de tratamento foram obtidas a partir de uma solução estoque (80 mg/mL), preparada pela dissolução do OE puro em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir desta, foram realizadas diluições seriadas em meio de cultura completo (MC), resultando nas concentrações finais de tratamento, que variaram entre 12,5 µg/mL e 800 µg/mL, de forma que a concentração de DMSO não ultrapassasse 0,5% do volume total final. Para cada concentração de tratamento e para cada linhagem celular, foram utilizadas sete repetições (poços) por placa, cada experimento foi repetido 3 vezes. Os controles deste ensaio (100% de células viáveis) foram realizados com MC contendo 0,5% de DMSO (v/v).

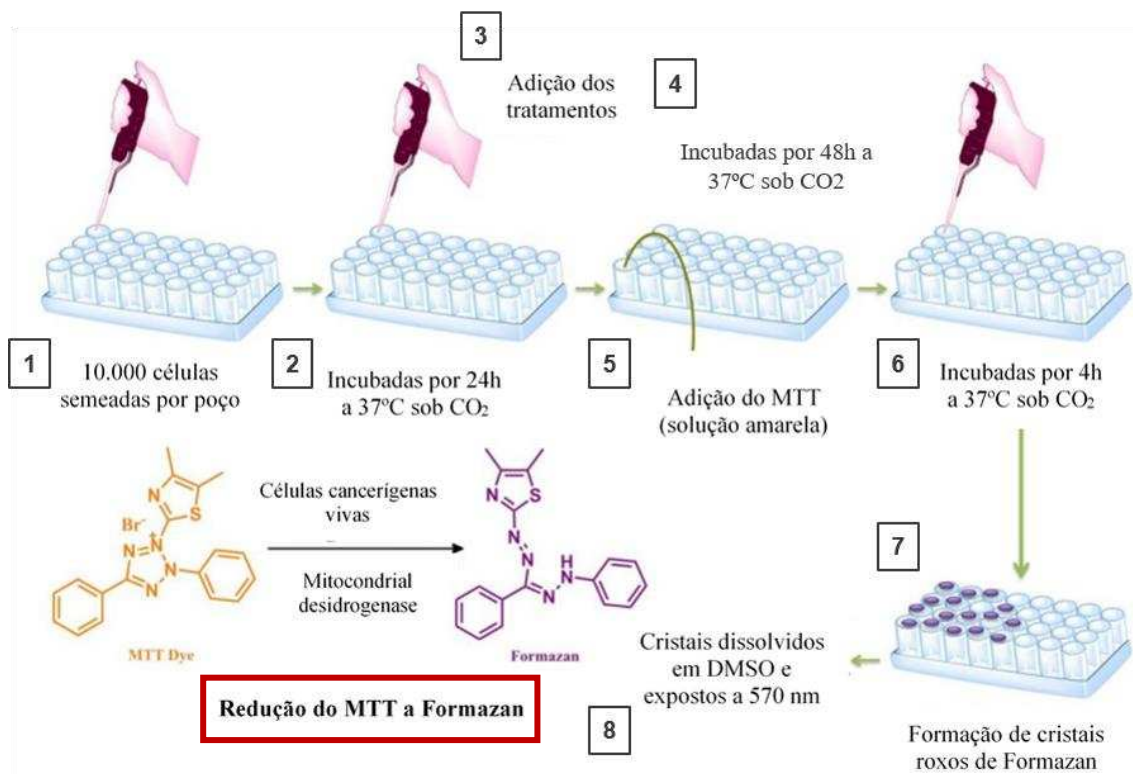
Após exposição aos tratamentos específicos, o meio contendo as drogas foi removido e a cada um dos poços foi adicionado MC contendo 10% de solução MTT (3-{4,5- dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólio bromido) a 0,5 mg/mL. As placas foram incubadas por 4h a 37°C. O meio foi removido e os cristais de Formazan formados foram dissolvidos em DMSO. A sobrevivência/proliferação celular foi avaliada a partir dos valores de absorbância das amostras obtidos em espectrofotômetro no comprimento de onda a 570 nm (FIGURA 4).

Os valores das concentrações inibitórias de 10% (IC₁₀), 50% (IC₅₀) e 90% (IC₉₀) foram calculados por meio de uma regressão não-linear log [Dose] versus Resposta Normalizada (porcentagens de células viáveis), utilizando os programas Microsoft Office Excel 2013® e GraphPad Prism® 5.0.

O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da IC₅₀. O IS indica a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma linhagem normal, e conseqüentemente, o potencial uso terapêutico desse composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde à razão entre a IC₅₀ do composto para células não-tumorais (BGM ou VERO) e a IC₅₀ do composto para células neoplásicas (HepG2, SW480 ou MCF-7), ou seja:

$$IS = \frac{IC50_{linhagem\ normal}}{IC50_{linhagem\ neoplásica}}$$

Figura 4 – Representação Esquemática do Ensaio de Viabilidade Celular por MTT



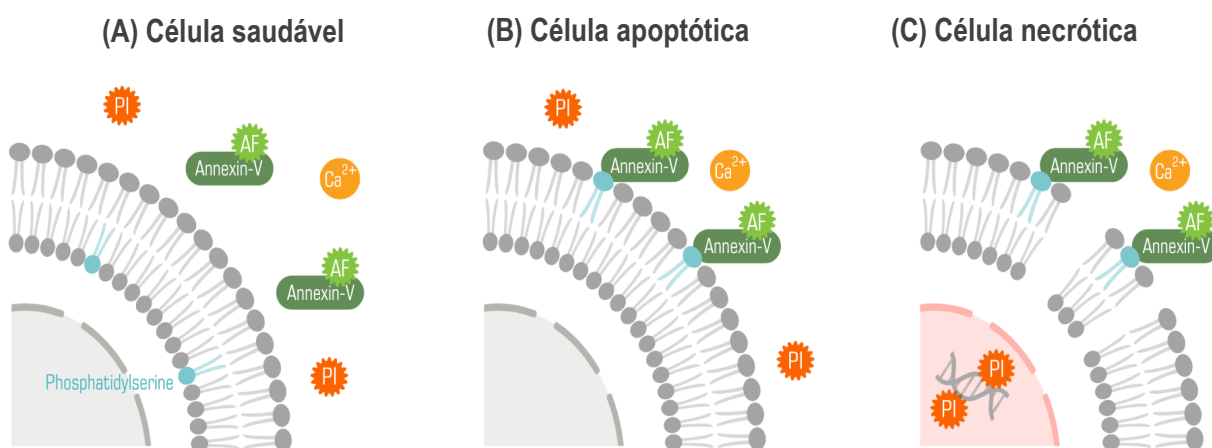
A imagem ilustra o procedimento do ensaio colorimétrico de MTT, utilizado para avaliar a atividade metabólica e a viabilidade celular, frequentemente em resposta a diferentes tratamentos. **Princípio do Ensaio (Retângulo vermelho):** O método baseia-se na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais, presentes em células vivas e metabolicamente ativas, de converterem o sal de tetrazólio amarelo (MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) em cristais de formazan, que possuem uma coloração roxa e são insolúveis em água. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis. **Etapas do Procedimento (Numeradas de 1 a 8):** **1-Semeadura das Células:** Inicialmente, 10.000 células são distribuídas em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços. **2-Incubação Inicial:** As células são incubadas por 24 horas a 37°C em uma atmosfera com CO₂ para permitir sua adesão à superfície do poço. **3-Adição dos Tratamentos:** As substâncias a serem testadas (ex: fármacos, extratos) são adicionadas aos poços. **4-Período de Tratamento:** A placa é incubada por 48 horas para que os tratamentos possam exercer seus efeitos sobre as células. **5-Adição do Reagente MTT:** A solução amarela de MTT é adicionada a todos os poços. **6-Formação do Formazan:** A placa é novamente incubada por 4 horas, período no qual as células viáveis metabolizam o MTT e formam cristais de formazan. **7-Visualização dos Cristais:** Ao final da incubação, observa-se a formação de precipitados roxos (cristais de formazan) nos poços contendo células vivas. **8-Solubilização e Leitura:** Os cristais de formazan são dissolvidos com um solvente apropriado (como DMSO), gerando uma solução homogênea de cor roxa. A intensidade da cor é quantificada medindo-se a absorbância em um leitor de placas a um comprimento de onda de 570 nm.

Fonte: Adaptado de PARIKH, K. P. (2016).

3.4. Ensaio de Apoptose

Para avaliação da morte celular, foi utilizado o ensaio de apoptose e necrose por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio (AN/PI). Esse ensaio se baseia em dois pontos: primeiro, na ligação entre Anexina-V-FITC e fosfatidilserina na membrana de células que estão entrando em processo apoptótico e, segundo, na ligação do iodeto de propídio (PI) ao DNA em células em processo final de apoptose ou necrose (FIGURA 5)

Figura 5 – Representação esquemática do ensaio de Anexina-V/FITC para detecção de apoptose



(A) Em células saudáveis, a fosfatidilserina (PS) é mantida na face interna da membrana plasmática. (B) Durante a apoptose, a PS é translocada para a face externa da membrana, onde funciona como um sinal de reconhecimento para macrófagos. O ensaio utiliza a Anexina V, que, marcada com FITC (fluorescência verde), liga-se especificamente a esses resíduos de fosfatidilserina expostos, em um processo dependente de Ca^{2+} . Como a Anexina V não consegue penetrar na membrana de células normais, ela cora apenas as células em apoptose. (C) O iodeto de propídio (PI, fluorescência vermelha) é um corante de DNA que penetra e cora apenas as células com a membrana danificada (em apoptose tardia ou necrose).

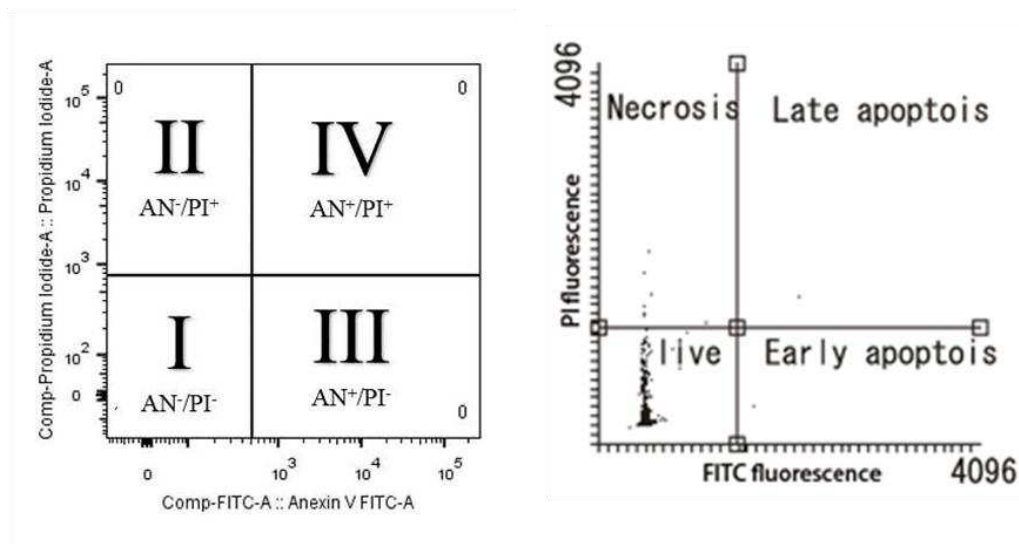
Fonte: Adaptado de Lumiprobe (2025).

Células HepG2 e SW480 foram tratadas durante 48h com a IC_{50} dos OEs foram tripsinizadas e a reação enzimática foi bloqueada com a adição de meio de cultivo completo com 10% de SFB. As células foram centrifugadas por 5 min a 600 rpm, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* celular foi ressuspensionado em PBS (1 mL). As células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em solução tampão Hank's (1 mL). As células passaram por uma nova etapa de centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* celular foi ressuspensionado em 200 μ L de Hank's contendo

5 µL de Anexina V-FITC (ImunoTools®, Friesoythe, NI, Alemanha). Em seguida, o material foi transferido para tubos de microcentrífuga (Eppendorf®) e refrigerado até o momento da análise no Citômetro de Fluxo (BD FACSVerse™, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Antes da contagem e análise, foi adicionado 5 µL de solução de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) na concentração estoque de 10 µg/mL. Foram analisados 10000 eventos em triplicata, totalizando 30000 eventos por amostra. utilizando o software FlowJo™ (v10.8, BD Life Sciences, Ashland, OR, EUA).

O gráfico dessa análise gerado pelo citômetro de fluxo apresenta quatro quadrantes e cada um apresenta um tipo de marcação (FIGURA 6): no quadrante I não ocorre a marcação dos eventos, ou seja: neste caso, a marcação por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídeo é negativa (AN-/PI-); no quadrante II, ocorre marcação apenas por Iodeto de Propídeo (AN-/PI+); no quadrante III ocorre marcação apenas por Anexina V-FITC (AN+/PI-); e, por fim, no quadrante IV as marcações por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídeo são positivas (AN+/PI+).

Figura 6 – Divisão dos quadrantes da Citometria de Fluxo



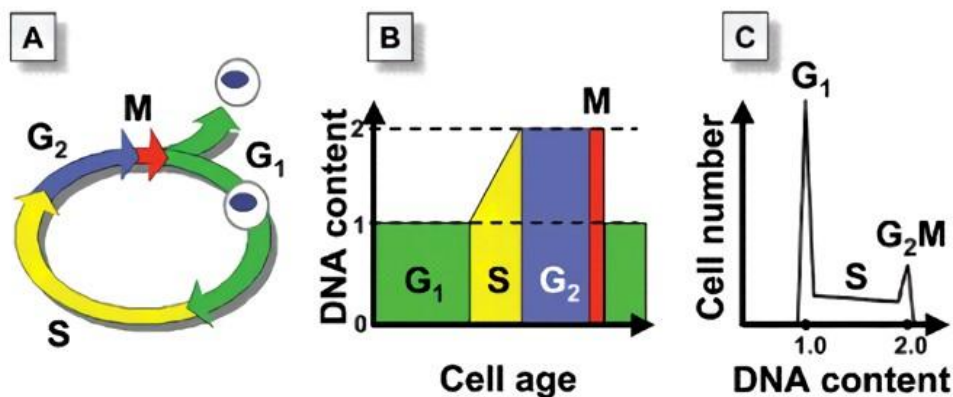
Ao combinar a Anexina V com o Iodeto de Propídeo, a citometria de fluxo permite a rápida distinção entre os diferentes estágios celulares. É possível discriminar: (I) células viáveis (Anexina V-/PI-), (II) células em apoptose inicial (Anexina V+/PI-), (III) células em apoptose tardia (Anexina V+/PI+) e (IV) células mortas/necróticas (Anexina V-/PI+).

Fonte: Adaptado de Nacalai Tesque (2025).

3.5. Avaliação do Ciclo Celular

Para avaliar se o tratamento com os OEs interfere no controle do ciclo celular, realizou-se ensaios de quantificação de DNA no interior das células por citometria de fluxo (FIGURA 7). Para essa análise foi utilizada uma solução que contém PI; um detergente para a permeabilização de membranas (Triton X-100); e Ribonuclease A, que garantiu a degradação do RNA e a marcação específica de DNA.

Figura 7 – Representação do ciclo celular



A imagem ilustra o ciclo de divisão celular através de três painéis diferentes: **(A) As Fases do Ciclo Celular:** Este diagrama circular mostra a sequência das fases do ciclo celular. G₁ (Intervalo 1): Fase de crescimento celular e síntese de proteínas e RNA S (Síntese): Fase em que ocorre a replicação do DNA G₂ (Intervalo 2): Período de crescimento contínuo e preparação final para a divisão celular. M (Mitose): Fase da divisão celular, que culmina na formação de duas células-filhas. **(B) Variação do Conteúdo de DNA:** O gráfico representa a quantidade de DNA em uma única célula ao longo do tempo. Na fase G₁, a célula possui uma quantidade de DNA basal (valor 1). Durante a fase S, essa quantidade dobra (valor 2). A célula mantém esse conteúdo de DNA duplicado durante as fases G₂ e M. **(C) Análise de uma População de Células:** Este histograma, típico de uma análise por citometria de fluxo, mostra a distribuição do conteúdo de DNA em uma população de células. O primeiro pico, maior, representa as células que estão na fase G₁ (com conteúdo de DNA 1.0) O segundo pico, menor, representa as células que estão nas fases G₂ ou M (com conteúdo de DNA 2.0). A região entre os dois picos corresponde às células na fase S, que estão ativamente replicando seu DNA e, portanto, possuem um conteúdo de DNA intermediário.

Fonte: DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* (2010).

As células HepG2 e SW480 tratadas durante 48h com a IC₅₀ dos OEs foram ressuspensas em 1mL de solução de tripsina a 37°C, e a reação enzimática foi bloqueada com a adição de meio de cultivo completo com 10% de SFB. Em seguida, as células foram ressuspensas em álcool etílico 70% (1 mL) e centrifugadas por 5 min a 600 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet*

celular foi ressuspenso em 200 μ L de solução contendo corante nuclear – 1 mL de PBS 5 mM EDTA + 200 μ L de solução estoque de RNase A + 50 μ L solução estoque de iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich) –, e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente para posterior leitura em citômetro de fluxo.

3.6. Análise Estatística

A análise estatística de três experimentos independentes foi realizada com o programa GrafPad Prism 5 (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA). Foram considerados significativos os dados cujo *p value* (*p*-valor) foram inferiores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Composição dos OEs

A CG-EM foi utilizada para identificar os componentes químicos dos óleos. 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, 2017), foi possível identificar os compostos presentes nos OEs.

A quantificação dos constituintes foi realizada a partir dos perfis do cromatograma utilizando áreas relativas dos picos (%). As composições químicas dos óleos estão apresentadas nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

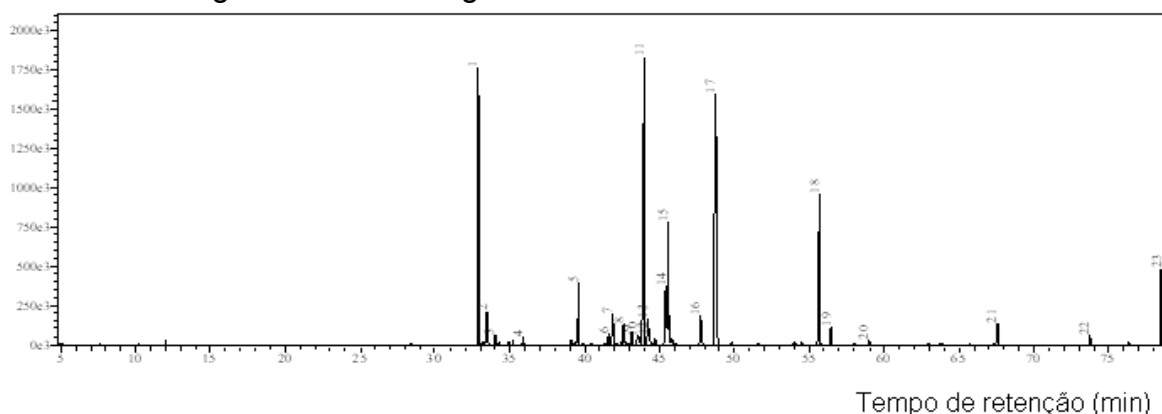
Tabela 1 – Composição química do óleo de *Matricaria chamomilla*

IA	IAt	TR	Componente	FM	IS%	[]%
1455	1454	32,895	β-Farneseno	C₁₅H₂₄	97	17,8
1474	1480	34,014	Germacreno D	C ₁₅ H ₂₄	83	0,45
1505	1505	35,892	(E, Z)- α-Farneseno	C ₁₅ H ₂₄	88	0,36
1570	1577	39,565	Espatuleno	C ₁₅ H ₂₄ O	93	3,73
1642	1649	43,550	β-Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	77	0,71
1649	1656	43,950	Óxido de Bisabolol II	C₁₅H₂₆O₂	93	21,5
1679	1674	45,581	α-Bisabolol	C ₁₅ H ₂₆ O	95	7,8
1719	1730	47,745	Camazuleno	C ₁₄ H ₁₆	88	1,63
1739	1748	48,758	Óxido de Bisabolol A	C₁₅H₂₆O₂	91	18,3
2595	2500	78,472	Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	95	2,92
%TOTAL						75,2%

IA: índice aritmético; IAt (índice aritmético teórico, segundo Adams, 2017); TR (tempo de retenção em minutos); FM: Fórmula molecular; IS: Índice de similaridade; [] Concentração.

Fonte: Autora (2023).

Figura 8 – Cromatograma do OE de *Matricaria chamomilla*



Fonte: Autora (2023).

A composição química do óleo de noz moscada está descrita na tabela 2.

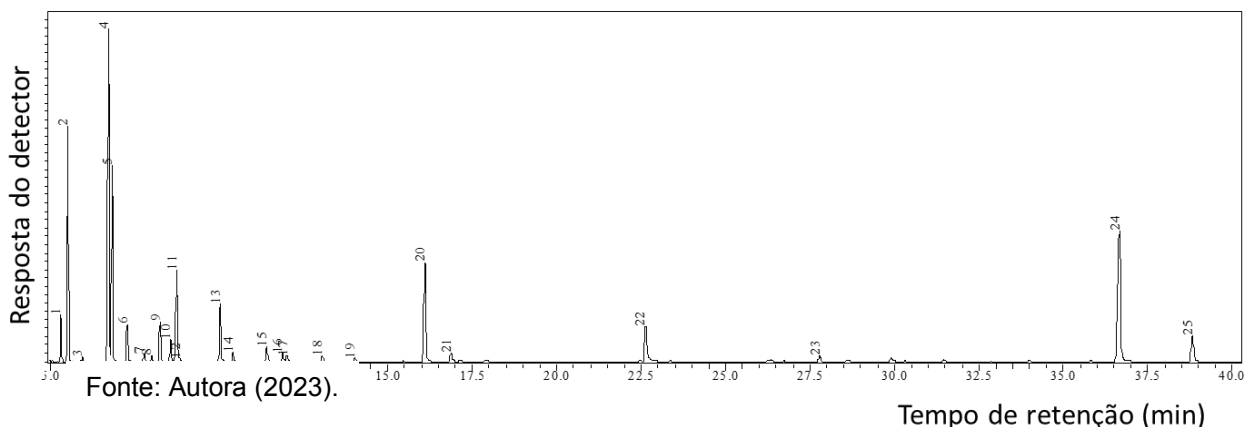
Tabela 2 – Composição química do óleo de *Myristica fragrans*.

IA	IAt	TR	Componente	FM	IS%	[]%
923	924	5,323	α-Tujeno	C ₁₀ H ₁₆	96	2,20
930	932	5,530	α-Pineno	C₁₀H₁₆	97	12,46
944	946	5,959	Canfeno	C ₁₀ H ₁₆	90	0,18
970	969	6,733	Sabineno	C₁₀H₁₆	95	22,89
974	974	6,843	β-Pineno	C₁₀H₁₆	97	10,69
988	988	7,281	Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	95	2,02
1003	1002	7,786	α-Felandreno	C ₁₀ H ₁₆	92	0,45
1008	1008	8,011	3-Careno	C ₁₄ H ₁₆	91	0,33
1014	1014	8,251	α -Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	94	2,39
1021	1022	8,569	o-Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	96	1,32
1025	1025	8,744	Silvestreno	C ₁₀ H ₁₆	92	6,50
1027	1026	8,842	1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	90	0,11
1054	1054	10,038	γ-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	98	3,90
1085	1086	10,416	Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	92	1,02
1098	1095	12,006	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	85	0,42
1118	1119	13,058	Trans-para-Menta-2,8-dien-1-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	87	0,39
1135	1140	14,025	cis-β-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	79	0,17
1173	1174	16,102	4-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	96	8,70
1187	1186	16,874	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	91	0,67
1284	1285	22,628	Safrol	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	94	3,33
1369	1374	27,783	Copaeno	C ₁₅ H ₂₄	87	0,50
1518	1517	36,666	Miristicina	C₁₁H₁₂O₃	85	15,65
1557	1555	38,819	Elemicina	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	80	2,53

%TOTAL 98,82%

IA: índice aritmético; IAt (índice aritmético teórico, segundo Adams, 2017); TR (tempo de retenção em minutos); FM: Fórmula molecular; IS: Índice de similaridade; [] Concentração.
 Fonte: Autora (2023).

Figura 9 – Cromatograma do OE de *Myristica fragrans*



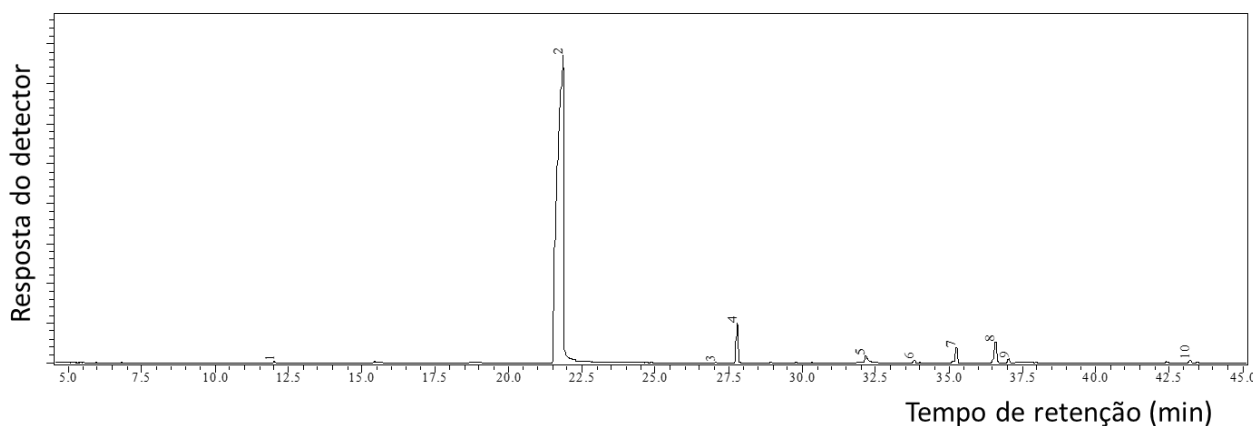
A análise química de ambos os óleos de canela mostrou que os constituintes majoritários eram fenilprapanoides (FIGURA 10). O óleo de *C. cassia* apresentou majoritariamente Trans-Cinamaldeído (91,3%) e α -Copaeno (3,7%).

Tabela 3 – Composição química do óleo de *Cinnamomum cassia*

IA	IAt	TR	Componente	FM	IS%	[]%
1098	1088	12,014	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	96	0,1
1270	1267	21,868	Trans-Cinamaldeído	C₉H₈O	98	91,3
1355	1356	27,063	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	94	0,1
1369	1374	27,789	α-Copaeno	C₁₅H₂₄	95	3,7
1442	1443	32,169	Trans-Acetato de Cinamila	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	95	0,5
1470	1480	33,817	Germacreno D	C ₁₅ H ₂₄	78	0,3
1494	1500	35,246	α -Muuroleno	C ₁₅ H ₂₄	95	1,3
1518	1523	36,583	δ -Cadineno	C ₁₅ H ₂₄	90	2,3
1525	1527	37,029	O-Metoxicinamaldeído	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	97	0,3
1635	1640	43,210	τ -Muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	86	0,2
					%TOTAL	99,8%

IA: índice aritmético; IAt (índice aritmético teórico, segundo Adams, 2017); TR (tempo de retenção em minutos); FM: Fórmula molecular; IS: Índice de similaridade; [] Concentração.
 Fonte: Autora (2023).

Figura 10 – Cromatograma do óleo de *Cinnamomum cassia*



Fonte: Autora (2023).

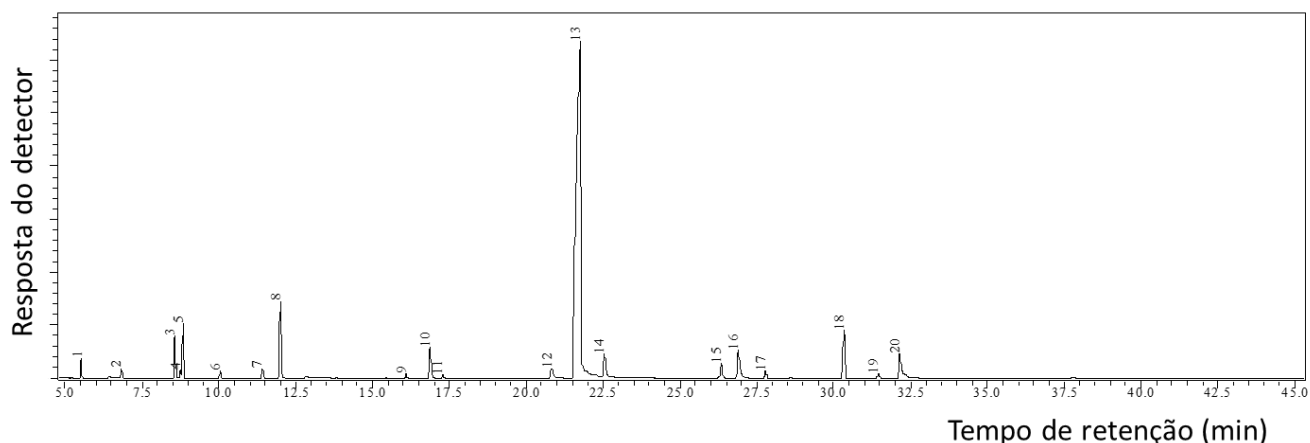
Enquanto que o óleo de *C. zeylanicum* mostrou como componentes majoritários o Trans-Cinamaldeído (68,9 %) e o Linalol (5,3%).

Tabela 4 – Composição química do óleo de *Cinnamomum zeylanicum*

IA	IAt	TR	Componente	FM	IS%	[]%
930	932	5,526	α-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	98	0,9
973	974	6,830	β-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	97	0,5
1021	1020	8,566	p-Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	95	2,5
1025	1024	8,738	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	92	0,5
1027	1026	8,830	Eucaliptol	C₁₀H₁₈O	96	3,2
1054	1054	10,039	γ-Terpineno	C ₁₀ H ₁₆	97	0,5
1085	1086	11,416	Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	96	0,6
1098	1088	12,004	Linalol	C₁₀H₁₈O	96	5,3
1173	1174	16,093	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	95	0,3
1187	1186	16,870	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	97	2,4
1194	1199	17,276	γ-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	92	0,2
1270	1267	21,762	Trans-Cinamaldeído	C₉H₈O	98	68,9
1346	1346	26,343	Acetato de α-Terpinila	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	93	1,2
1355	1356	26,890	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	94	2,7
1369	1374	27,786	α-Copaeno	C ₁₅ H ₂₄	95	0,6
1412	1417	30,333	β-Cariofileno	C₁₅H₂₄	95	4,4
1431	1432	31,455	Trans-α - Bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	96	0,4
1442	1443	32,151	Trans-Acetato de Cinamila	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	95	2,1
					%TOTAL	97,2%

IA: índice aritmético; IAt (índice aritmético teórico, segundo Adams, 2017); TR (tempo de retenção em minutos); FM: Fórmula molecular; IS: Índice de similaridade; [] Concentração.
 Fonte: Autora (2023).

Figura 11 – Cromatograma do óleo de *Cinnamomum zeylanicum*



Fonte: Autora (2023).

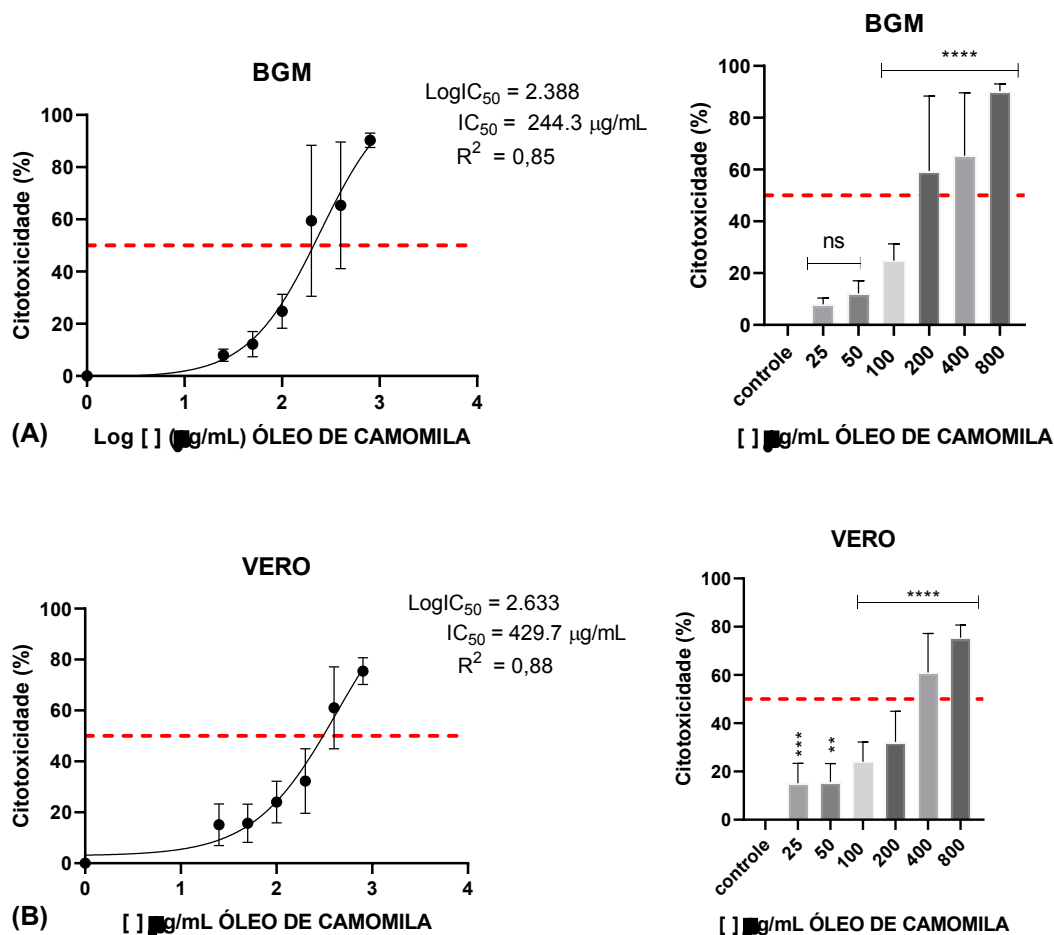
4.2. Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados com as linhagens não-tumorais BGM e VERO, e com as linhagens celulares tumorais HepG2, SW480 e MCF-7. A taxa de mortalidade celular em função da concentração dos OEs para as linhagens celulares está representada nas figuras abaixo: óleo de *Matricaria chamomilla* (FIGURAS 12 e 13) – óleo de *Myristica fragrans* (FIGURAS 14 e 15) – óleo de *Cinnamomum cassia* (FIGURAS 16 e 17) e óleo de *Cinnamomum zeylanicum* (FIGURAS 18 e 19).

A concentração dos óleos que levou à morte de aproximadamente 50% da população total de células (IC₅₀) está representada nas tabelas a seguir: óleo de *Matricaria chamomilla* (TABELA 5) – óleo de *Myristica fragrans* (TABELA 6) – óleo de *Cinnamomum cassia* (TABELA 7) e óleo de *Cinnamomum zeylanicum* (TABELA 8). O valor de IC₅₀ foi calculado utilizando uma regressão não linear, log (da concentração do óleo em µg/mL) x resposta normalizada. Nas tabelas também estão representados os valores do coeficiente de determinação da regressão (R²). Foi possível calcular também os valores de concentrações equivalentes às porcentagens de morte celular correspondentes a 10% da população total de células (IC₁₀), utilizando a equação da reta, abaixo, onde: X representa o logaritmo da concentração (log []) em µg/mL e Y representa a porcentagem de morte celular.

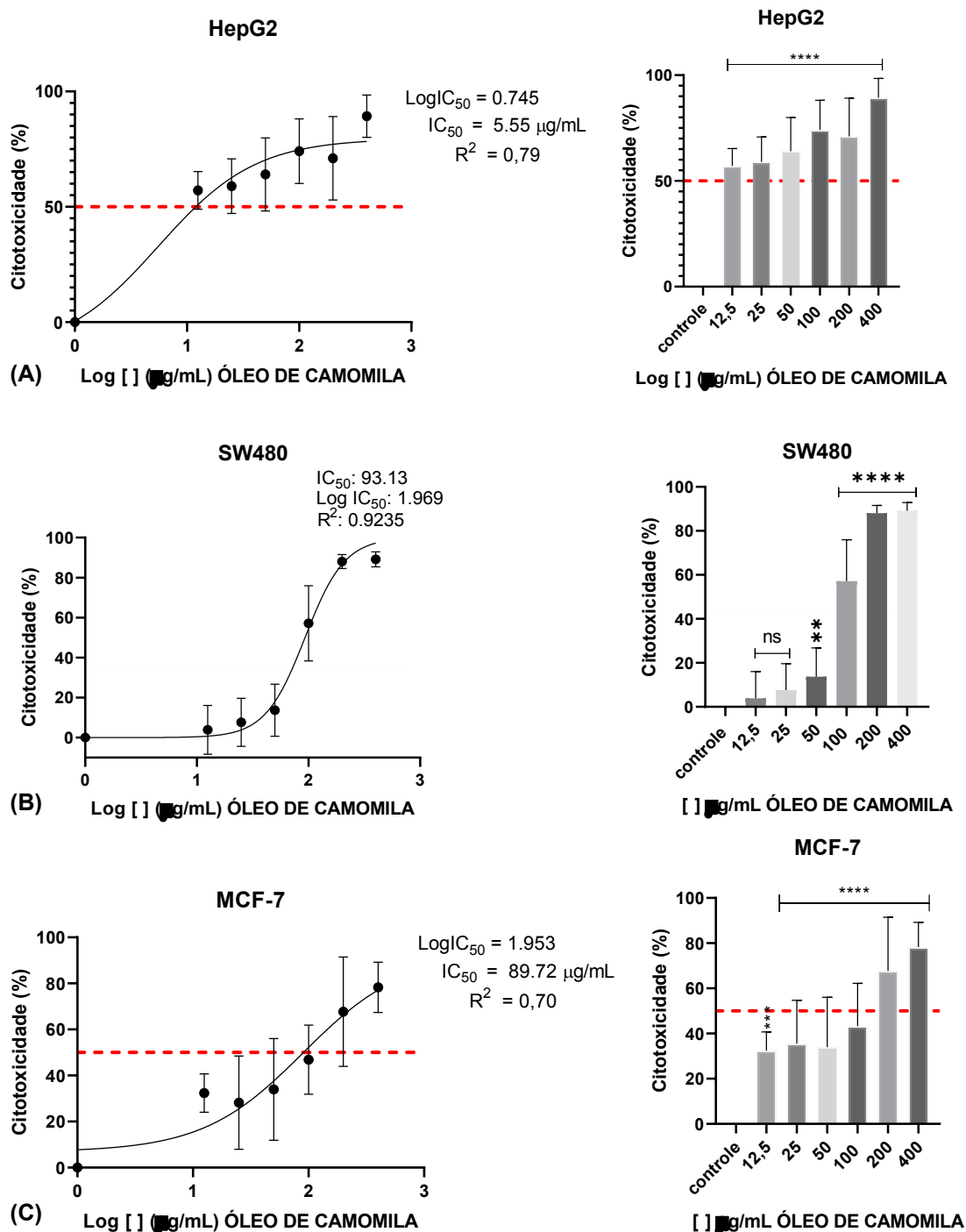
$$y = \frac{100}{1 + 10^{(LogIC_{50} - X) * HillSlope}}$$

Figura 12 – Efeito citotóxico do OE de *Matricaria chamomilla* em linhagens celulares não-tumorais



Análise da citotoxicidade do OE de *Matricaria chamomilla* em linhagens celulares não-tumorais de rim de macaco (A) BGM e (B) VERO. Para cada linhagem, o gráfico à esquerda representa a curva de regressão não linear dose-resposta, utilizada para calcular o valor da IC₅₀ (concentração inibitória de 50%). O gráfico à direita compara a citotoxicidade das concentrações de 25 a 800 µg/mL do tratamento com OE com o grupo controle (não tratado). As células foram incubadas com o óleo por 48h. Os pontos e as barras representam a média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Asteriscos (****) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,0001), analisada por ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 13 – Efeito citotóxico do OE de *Matricaria chamomilla* em linhagens celulares tumorais



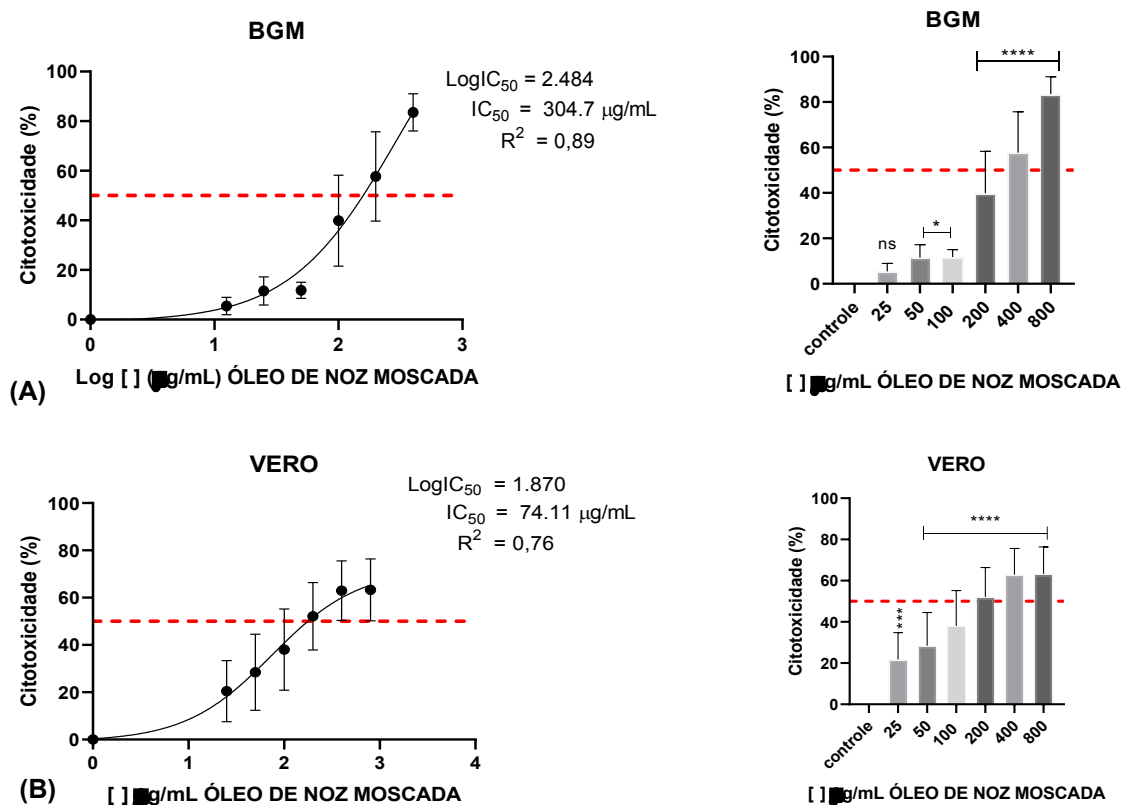
Análise da citotoxicidade do OE de *Matricaria chamomilla* em linhagens celulares tumorais (A) HepG2; (B) SW480 e (C) MCF-7. Para cada linhagem, o gráfico à esquerda representa a curva de regressão não linear dose-resposta, utilizada para calcular o valor da IC₅₀ (concentração inibitória de 50%). O gráfico à direita compara a citotoxicidade das concentrações de 12,5 a 400 µg/mL do tratamento com OE com o grupo controle (não tratado). As células foram incubadas com o óleo por 48h. Os pontos e as barras representam a média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Asteriscos (****) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,0001), analisada por ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Tabela 5 – Concentrações inibitórias do óleo de *Matricaria chamomilla*

Óleo de <i>Matricaria chamomilla</i>					
Célula	BGM	VERO	HepG2	SW480	MCF-7
IC ₁₀ (µg/mL)	8,83	24,11	2,04	30,42	25,7
IC ₅₀ (µg/mL)	244,3	429,7	5,55	93,13	89,72
IC ₉₀ (µg/mL)	1041,8	1106,6	446,68	238,1	377,3
Log IC ₅₀	2,388	2,633	0,7449	1,969	1,953
R ₂	0,85	0,88	0,83	0,92	0,70
HillSlope	1,190	0,7644	-2,699	-2,445	1,587

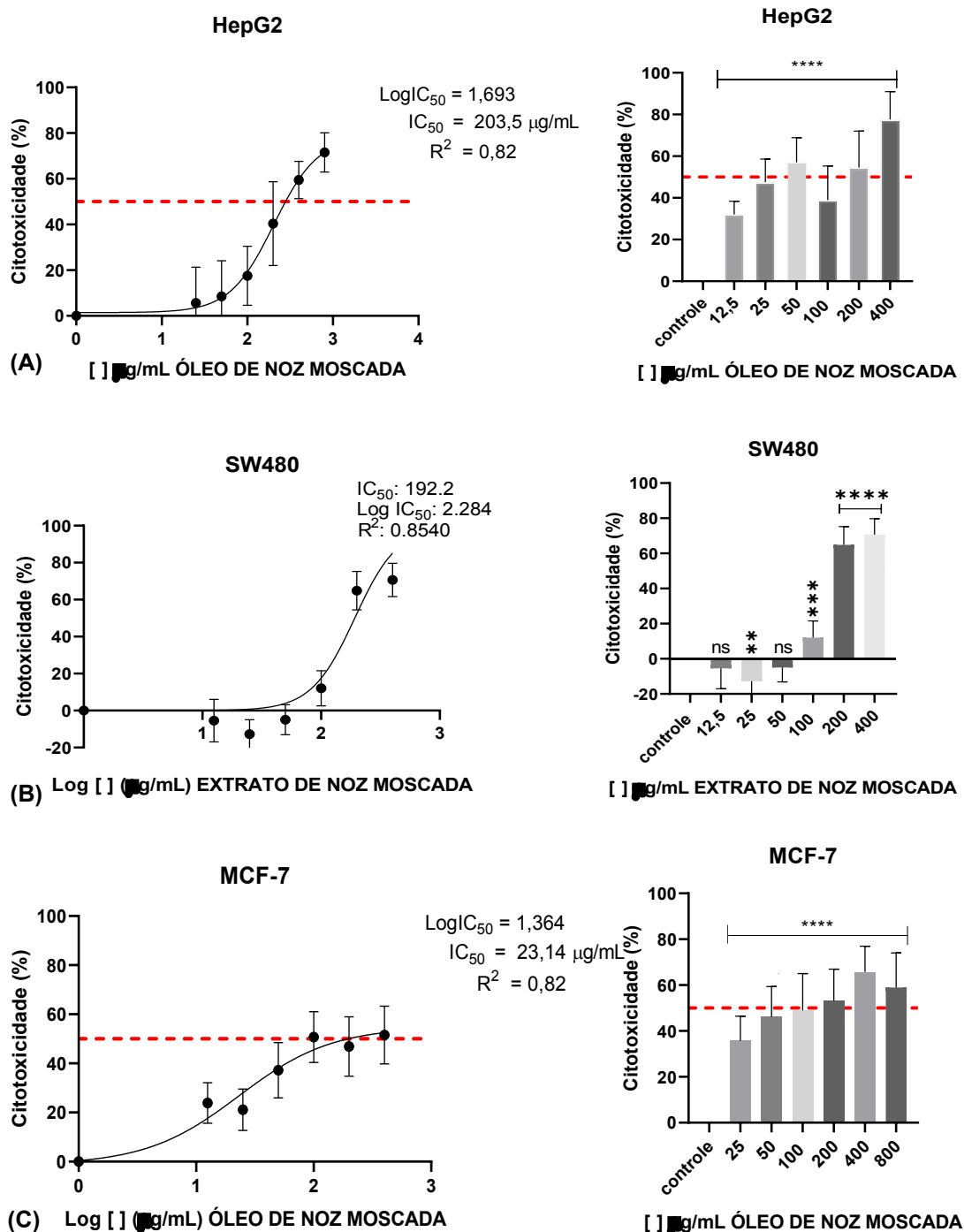
Fonte: Autora (2023).

Figura 14 – Efeito citotóxico do OE de *Myristica fragrans* em linhagens celulares não-tumorais



Análise da citotoxicidade do OE de *Myristica fragrans* em linhagens celulares não-tumorais de rim de macaco (A) BGM e (B) VERO. Para cada linhagem, o gráfico à esquerda representa a curva de regressão não linear dose-resposta, utilizada para calcular o valor da IC₅₀ (concentração inibitória de 50%). O gráfico à direita compara a citotoxicidade das concentrações de 25 a 800 µg/mL do tratamento com OE com o grupo controle (não tratado). As células foram incubadas com o óleo por 48h. Os pontos e as barras representam a média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Asteriscos (****) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$), analisada por ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 15 – Efeito citotóxico do OE de *Myristica fragrans* em linhagens celulares tumorais



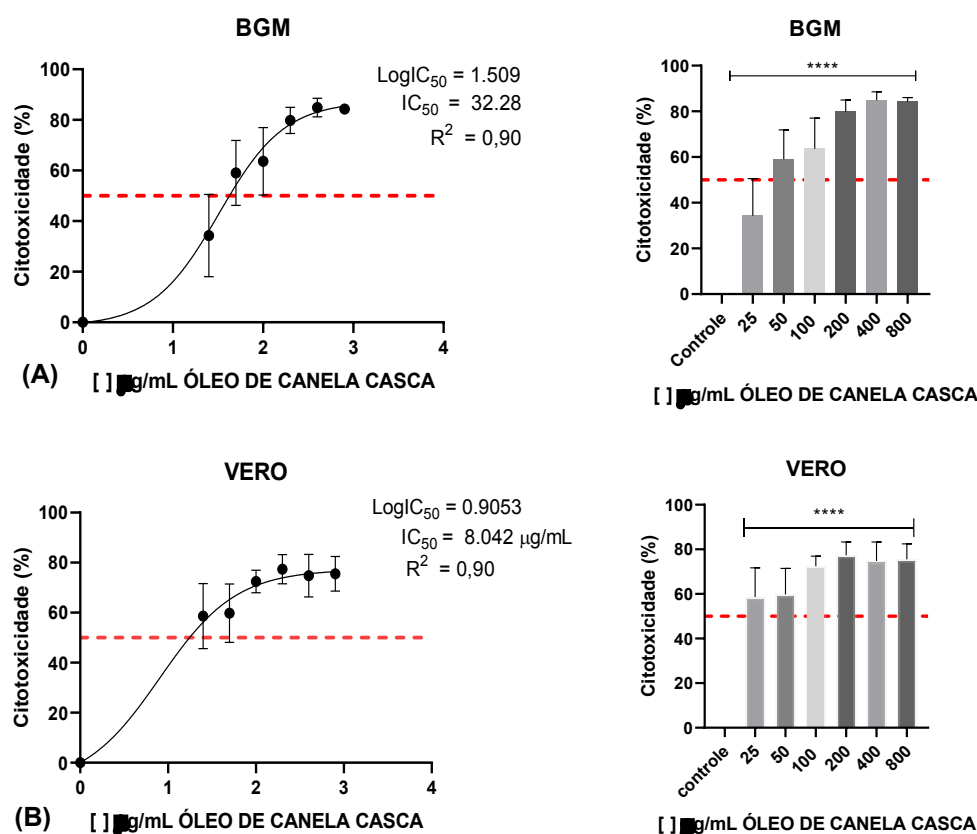
Análise da citotoxicidade do OE de *Myristica fragrans* em linhagens celulares tumorais (A) HepG2; (B) SW480 e (C) MCF-7. Para cada linhagem, o gráfico à esquerda representa a curva de regressão não linear dose-resposta, utilizada para calcular o valor da IC₅₀ (concentração inibitória de 50%). O gráfico à direita compara a citotoxicidade das concentrações de 12,5 a 400 µg/mL do tratamento com OE com o grupo controle (não tratado). As células foram incubadas com o óleo por 48h. Os pontos e as barras representam a média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Asteriscos (****) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$), analisada por ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Tabela 6 – Concentrações inibitórias do óleo de *Myristica fragrans*

Óleo de noz moscada					
Célula	BGM	VERO	HepG2	SW480	MCF-7
IC ₁₀ (µg/mL)	22,74	10,63	1,27	67,6	6,26
IC ₅₀ (µg/mL)	304,7	74,11	203,5	192,2	23,14
IC ₉₀ (µg/mL)	478,6	552,3	616,6	635,7	186,2
Log IC ₅₀	2,484	1,870	2,308	2,284	1,364
R ₂	0,89	0,76	0,82	0,85	0,82
HillSlope	1,154	0,9599	1,693	-2,375	1,099

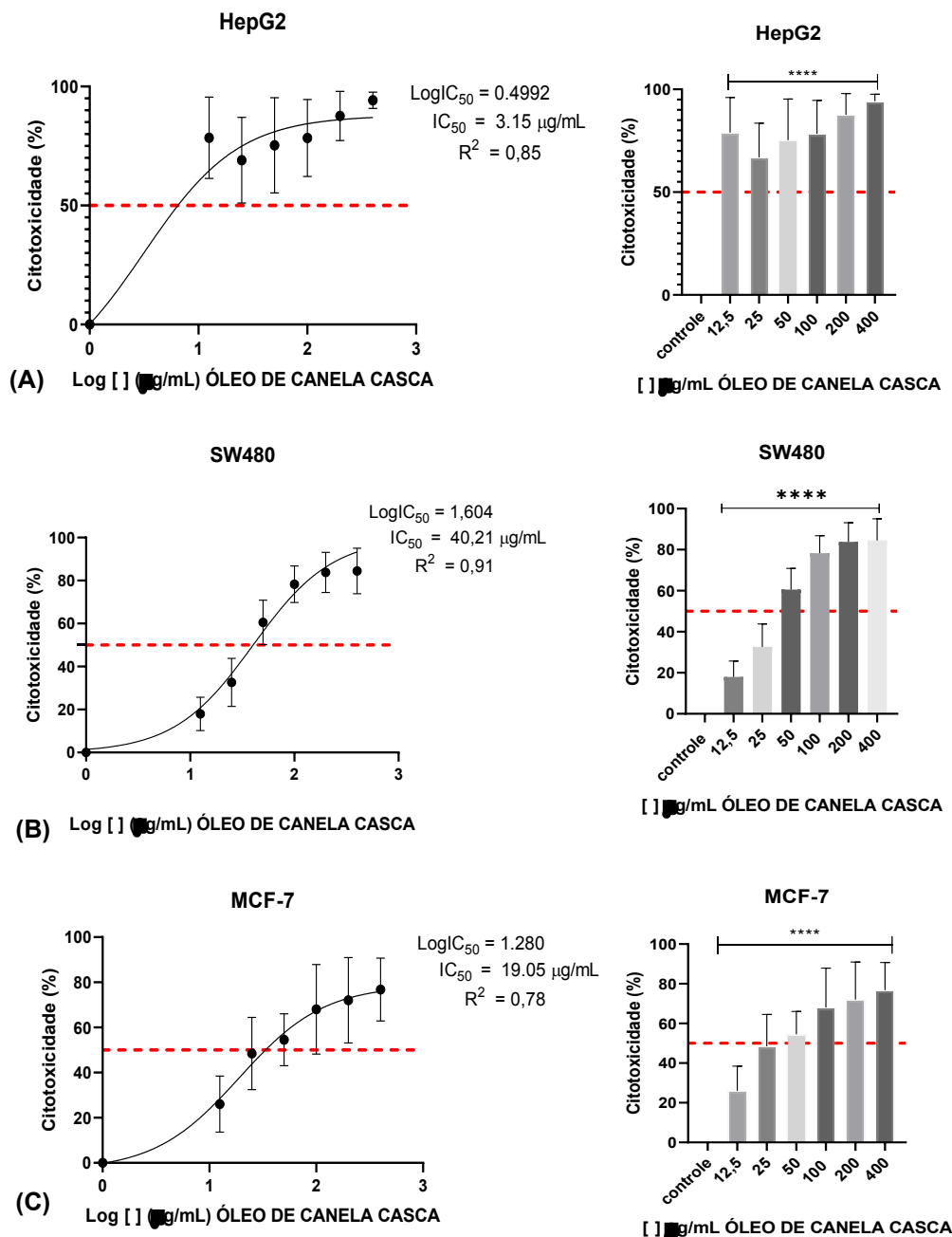
Fonte: Autora (2023).

Figura 16 – Efeito citotóxico do OE de *C. cassia* em linhagens celulares não-tumorais



Análise da citotoxicidade do OE de *C. cassia* em linhagens celulares não-tumorais de rim de macaco (A) BGM e (B) VERO. Para cada linhagem, o gráfico à esquerda representa a curva de regressão não linear dose-resposta, utilizada para calcular o valor da IC₅₀ (concentração inibitória de 50%). O gráfico à direita compara a citotoxicidade das concentrações de 25 a 800 µg/mL do tratamento com OE com o grupo controle (não tratado). As células foram incubadas com o óleo por 48h. Os pontos e as barras representam a média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Asteriscos (****) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$), analisada por ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 17 – Efeito citotóxico do OE de *C. cassia* em linhagens celulares tumorais



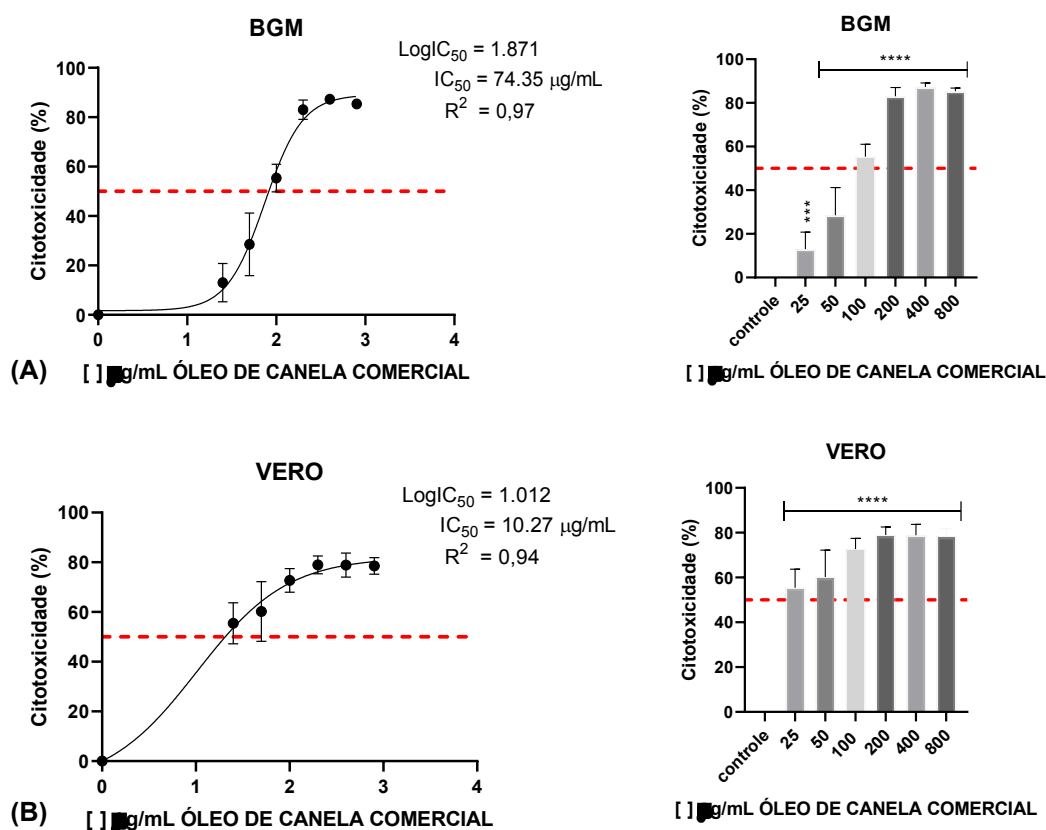
Análise da citotoxicidade do OE de *C. cassia* em linhagens celulares tumorais (A) HepG2; (B) SW480 e (C) MCF-7. Para cada linhagem, o gráfico à esquerda representa a curva de regressão não linear dose-resposta, utilizada para calcular o valor da IC₅₀ (concentração inibitória de 50%). O gráfico à direita compara a citotoxicidade das concentrações de 12,5 a 400 µg/mL do tratamento com OE com o grupo controle (não tratado). As células foram incubadas com o óleo por 48h. Os pontos e as barras representam a média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Asteriscos (****) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,0001), analisada por ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Tabela 7 – Concentrações inibitórias do óleo de *C. cassia*

Óleo de <i>Cinnamomum cassia</i>					
Célula	BGM	VERO	HepG2	SW480	MCF-7
IC ₁₀ (µg/mL)	6,5	2,02	1,23	10,1	3,95
IC ₅₀ (µg/mL)	32,28	8,04	3,15	40,21	19,05
IC ₉₀ (µg/mL)	380,2	238,7	309	194,9	96,2
Log IC ₅₀	1,509	0,9053	0,4992	1,604	1,280
R ₂	0,90	0,90	0,84	0,91	0,78
HillSlope	1,193	0,8140	0,3998	1,146	1,092

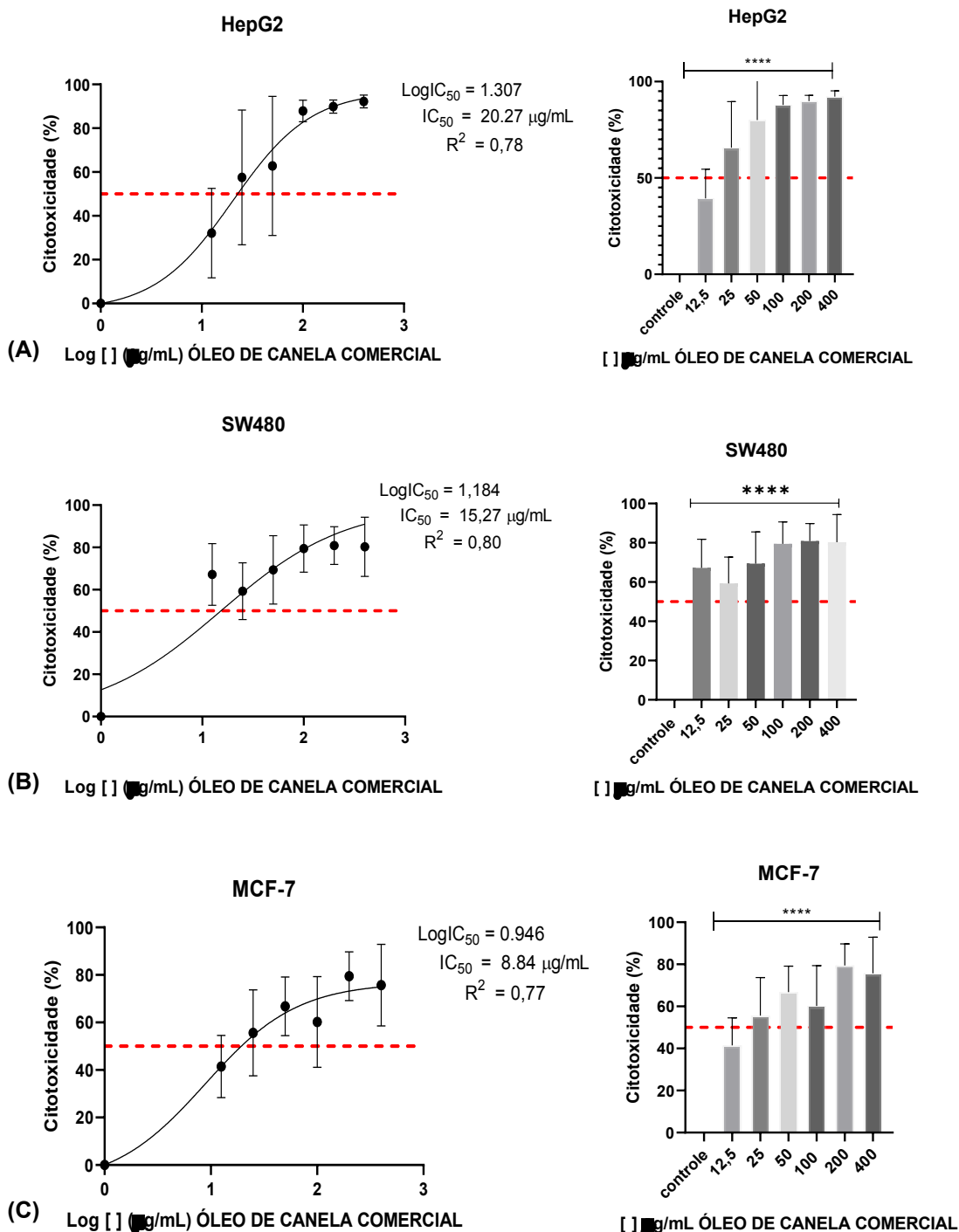
Fonte: Autora (2023).

Figura 18 – Efeito citotóxico do OE de *C. zeylanicum* em linhagens celulares não-tumorais



Análise da citotoxicidade do OE de *C. zeylanicum* em linhagens celulares não-tumorais de rim de macaco (A) BGM e (B) VERO. Para cada linhagem, o gráfico à esquerda representa a curva de regressão não linear dose-resposta, utilizada para calcular o valor da IC₅₀ (concentração inibitória de 50%). O gráfico à direita compara a citotoxicidade das concentrações de 25 a 800 µg/mL do tratamento com OE com o grupo controle (não tratado). As células foram incubadas com o óleo por 48h. Os pontos e as barras representam a média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Asteriscos (****) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,0001), analisada por ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Figura 19 – Efeito citotóxico do OE de *C. zeylanicum* em linhagens celulares tumorais



Análise da citotoxicidade do OE de *C. zeylanicum* em linhagens celulares tumorais (A) HepG2; (B) SW480 e (C) MCF-7. Para cada linhagem, o gráfico à esquerda representa a curva de regressão não linear dose-resposta, utilizada para calcular o valor da IC₅₀ (concentração inibitória de 50%). O gráfico à direita compara a citotoxicidade das concentrações de 12,5 a 400 µg/mL do tratamento com OE com o grupo controle (não tratado). As células foram incubadas com o óleo por 48h. Os pontos e as barras representam a média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Asteriscos (****) indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,0001), analisada por ANOVA seguida do teste de Dunnett.

Tabela 8 – Concentrações inibitórias do óleo de *C. zeylanicum*

Óleo de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>					
Célula	BGM	VERO	HepG2	SW480	MCF-7
IC ₁₀ (µg/mL)	20,42	2,59	3,24	11,04	2,53
IC ₅₀ (µg/mL)	74,35	10,27	20,27	15,27	8,84
IC ₉₀ (µg/mL)	562,34	563,7	354,8	123,1	186,2
Log IC ₅₀	1,871	1,012	1,307	1,184	0,9464
R ₂	0,97	0,94	0,78	0,81	0,77
HillSlope	2,039	0,9023	1,123	0,7087	0,6828

Fonte: Autora (2023).

4.2.1. Índice de Seletividade dos Compostos (IS)

A partir dos dados obtidos pelas análises de citotoxicidade é possível calcular o índice de seletividade (IS) dos compostos testados (TABELA 9).

Tabela 9 – Índice de seletividade (IS) dos OEs

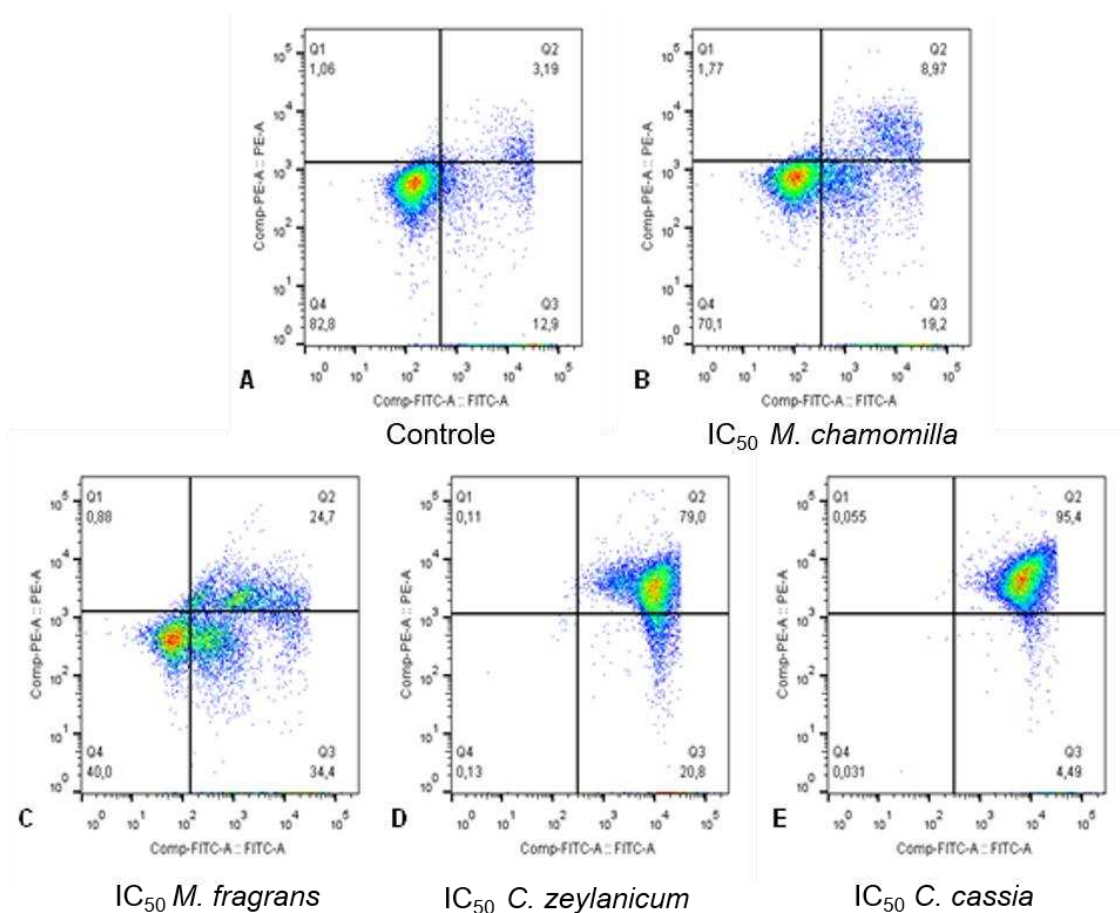
Óleo essencial	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>Myristica fragrans</i>	<i>Cinnamomum cassia</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>
IS _{BGM/HepG2} (µg/mL)	44,01	1,49	10,24	3,66
IS _{BGM/SW480} (µg/mL)	2,62	1,58	0,80	4,86
IS _{BGM/MCF-7} (µg/mL)	2,72	13,16	1,69	8,84
IS _{VERO/HepG2} (µg/mL)	77,4	0,36	2,55	0,5
IS _{VERO/SW480} (µg/mL)	4,6	0,38	0,2	0,6
IS _{VERO/MCF-7} (µg/mL)	4,8	3,2	0,42	1,2

Fonte: Autora (2023)

4.3. Avaliação de morte celular

Para avaliar o tipo de morte celular induzida pelos OEs, realizou-se ensaios por citometria de fluxo por meio da marcação com Anexina-V/FITC e iodeto de propídeo (PI). As figuras 20 e 21 apresentam os resultados do ensaio de apoptose por citometria de fluxo na linhagem celular HepG2.

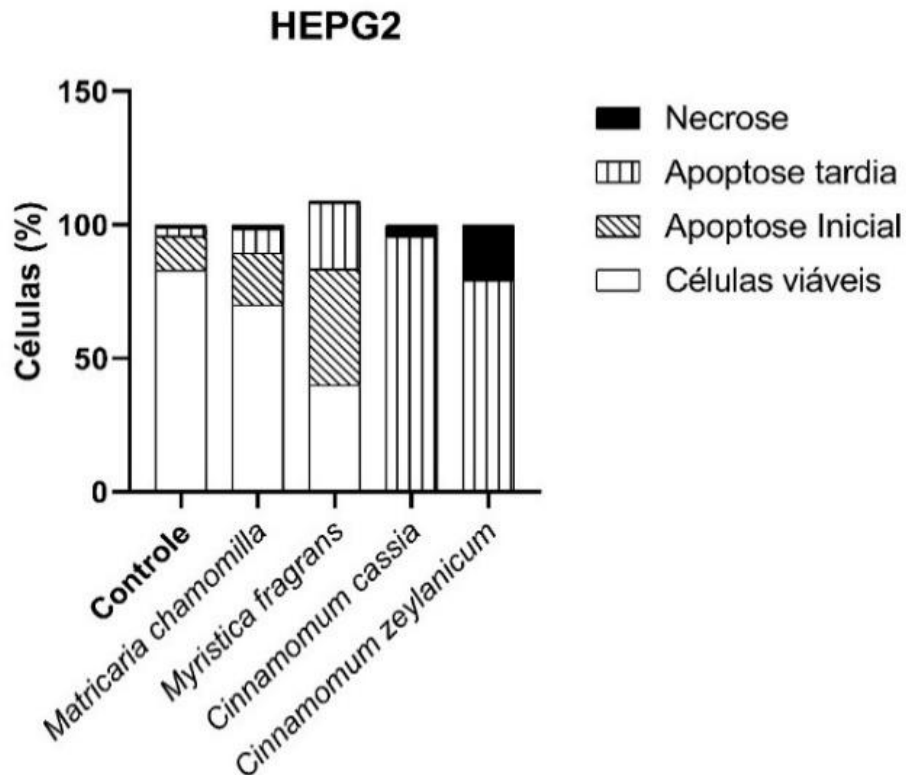
Figura 20 – Efeito do tratamento da linhagem celular de carcinoma hepatocelular (HepG2) tratada com a IC₅₀ dos OEs avaliado por citometria de fluxo



(A) Células HepG2 controle. Células HepG2 foram tratadas por 48h com (B) IC₅₀ do óleo de *Matricaria chamomilla*; (C) IC₅₀ do óleo de *Myristica fragrans*; (D) IC₅₀ do óleo de *Cinnamomum zeylanicum*; (E) IC₅₀ do óleo de *Cinnamomum cassia*. Em seguida, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (PI) para análise da apoptose. Os quadrantes no gráfico de pontos representam: (inferior esquerdo) células viáveis (Anexina V⁻/PI⁻), (inferior direito) células em apoptose inicial (Anexina V⁺/PI⁻), (superior direito) células em apoptose tardia e (superior esquerdo) células necróticas (Anexina V⁺/PI⁺).

Em 20-A, podemos observar que o grupo controle (AN-/PI-), apresentou uma alta população de células viáveis (92,8%). Os demais quadrantes apresentaram populações basais de apoptose tardia (3,19%), apoptose inicial (12,9%) e necrose (1,06%). Em 20-B, o tratamento com a IC₅₀ de *M. chamomilla* reduziu a população viável para 70,1%. Houve um aumento significativo na população em apoptose inicial (19,2%) e um aumento mais discreto na apoptose tardia (8,97%). A necrose (1,77%) manteve-se baixa. O total de células em morte apoptótica (inicial + tardia) foi de 28,17%. O tratamento com a IC₅₀ de *M. fragrans* (20-C), demonstrou um efeito citotóxico mais pronunciado. A população viável foi reduzida para 40,0%. O principal efeito foi a indução de apoptose, com 34,4% das células em apoptose inicial e 24,7% em apoptose tardia. A população necrótica (0,88%) foi insignificante. O total de células em morte apoptótica (inicial + tardia) foi de 59,1%. A IC₅₀ de *C. zeylanicum* (20-D) induziu morte celular massiva. A população de células viáveis foi quase erradicada (0,13%). As células se acumularam predominantemente na fase de apoptose tardia (79,0%), com uma fração ainda em apoptose inicial (20,8%). O total de células em morte apoptótica foi de 99,8%. Similarmente, o tratamento com a IC₅₀ de *C. cassia* (20-E) foi extremamente citotóxico, eliminando as células viáveis (0,031%). O efeito foi ainda mais intenso, empurrando quase todas as células para a apoptose tardia (95,4%), com poucas restantes em apoptose inicial (4,49%). O total de células em morte apoptótica foi de 99,89%.

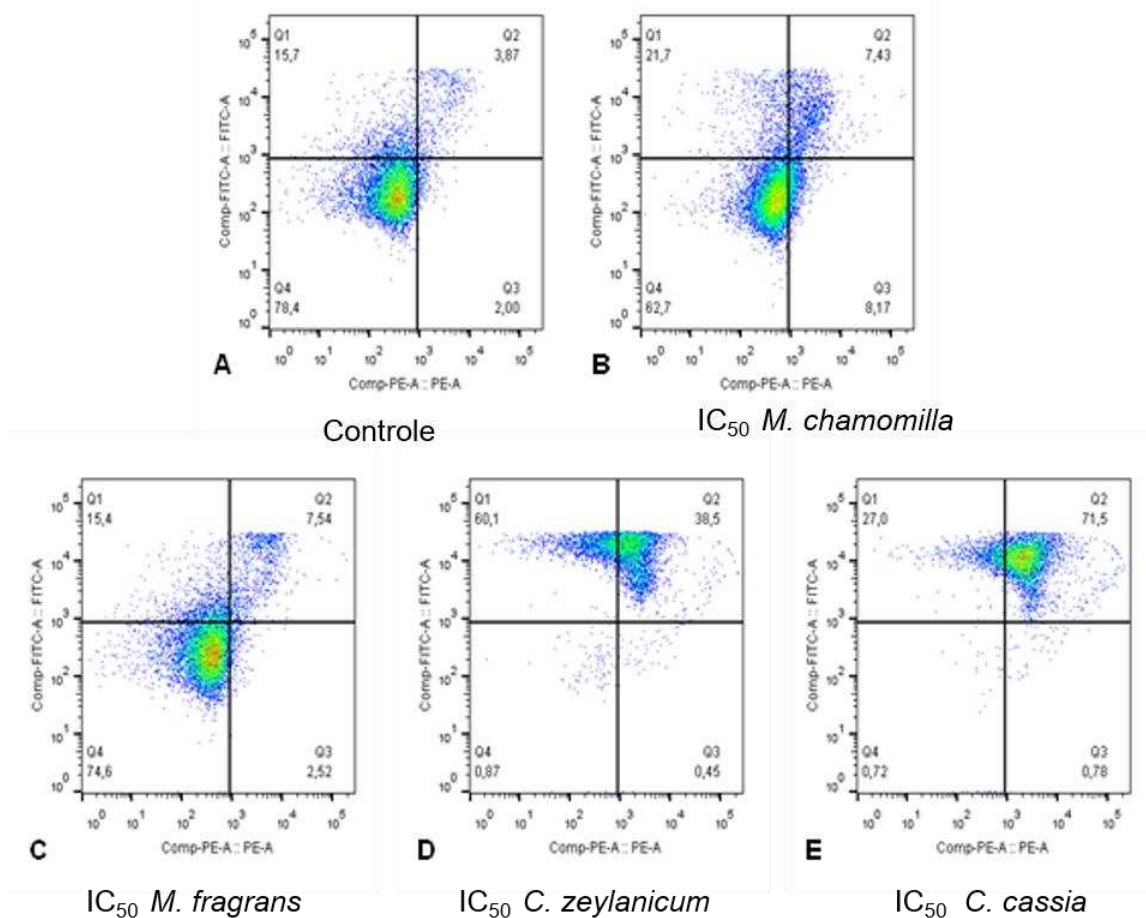
Figura 21 – Perfil da morte celular induzida por diferentes OEs em células de hepatocarcinoma (HepG2)



As células HepG2 foram tratadas com a IC₅₀ dos OEs de *Matricaria chamomilla*, *Myristica fragrans*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum zeylanicum*. A distribuição percentual de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose foi quantificada por citometria de fluxo após dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio. As barras representam a média dos percentuais de cada população celular.

As figuras 22 e 23 apresentam os resultados do ensaio de apoptose por citometria de fluxo na linhagem celular SW480.

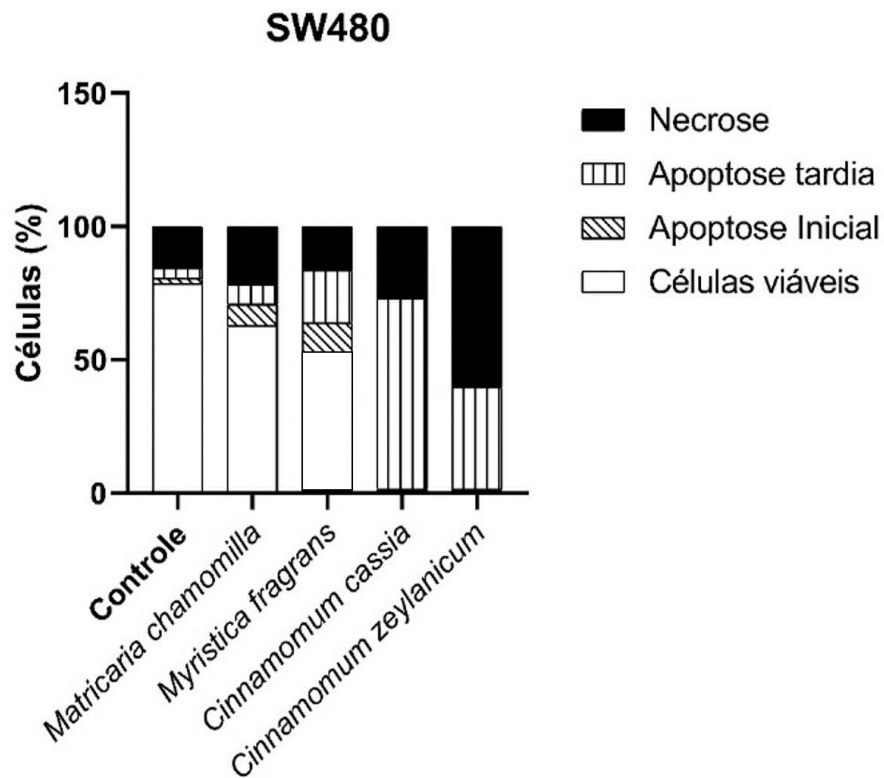
Figura 22 – Efeito do tratamento da linhagem celular de câncer colorretal (SW480) tratada com a IC₅₀ dos OEs avaliado por citometria de fluxo



(A) Células SW480 controle. Células SW480 foram tratadas por 48h com (B) IC₅₀ do óleo de *Matricaria chamomilla*; (C) IC₅₀ do óleo de *Myristica fragrans*; (D) IC₅₀ do óleo de *Cinnamomum zeylanicum*; (E) IC₅₀ do óleo de *Cinnamomum cassia*. Em seguida, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (PI) para análise da apoptose. Os quadrantes no gráfico de pontos representam: (inferior esquerdo) células viáveis (Anexina V⁻/PI⁻), (inferior direito) células em apoptose inicial (Anexina V⁺/PI⁻), (superior direito) células em apoptose tardia e (superior esquerdo) células necróticas (Anexina V⁺/PI⁺).

O grupo controle (AN-/PI-) representado em 22-A, apresentou uma população majoritariamente viável (78,4%). A população basal de morte foi dominada por necrose (15,7%), com pouca apoptose tardia (3,87%) ou inicial (2,00%). Este alto nível de necrose basal pode ser uma característica intrínseca desta linhagem ou indicar estresse de cultivo. O tratamento com a IC₅₀ do óleo de *Matricaria chamomilla* (22-B), reduziu levemente a população viável para 62,7%. O principal mecanismo de morte induzido foi a necrose (21,7%), que aumentou em relação ao controle. A morte por apoptose (inicial + tardia) foi de 15,6%. O tratamento com a IC₅₀ de *M. fragrans* (22-C) teve um impacto mínimo na viabilidade, que permaneceu alta em 74,6%. A necrose (15,4%) ficou similar ao controle, e a apoptose total foi de apenas 10,06%. A IC₅₀ de *C. zeylanicum* (22-D) induziu morte celular massiva, quase erradicando a população viável (0,97%). Diferente da HepG2 (que morreu por apoptose), o perfil de morte nesta linhagem foi misto, com predominância de necrose (60,1%) sobre a apoptose tardia (38,5%). Similarmente, a IC₅₀ de *C. cassia* (22-E) eliminou as células viáveis (0,72%). O perfil de morte também foi misto (necrose + apoptose), mas com uma inversão: a apoptose tardia (71,5%) foi o mecanismo dominante, embora a necrose (27,0%) ainda fosse muito significativa.

Figura 23 – Perfil da morte celular induzida por diferentes OEs em células de câncer colorretal (SW480)

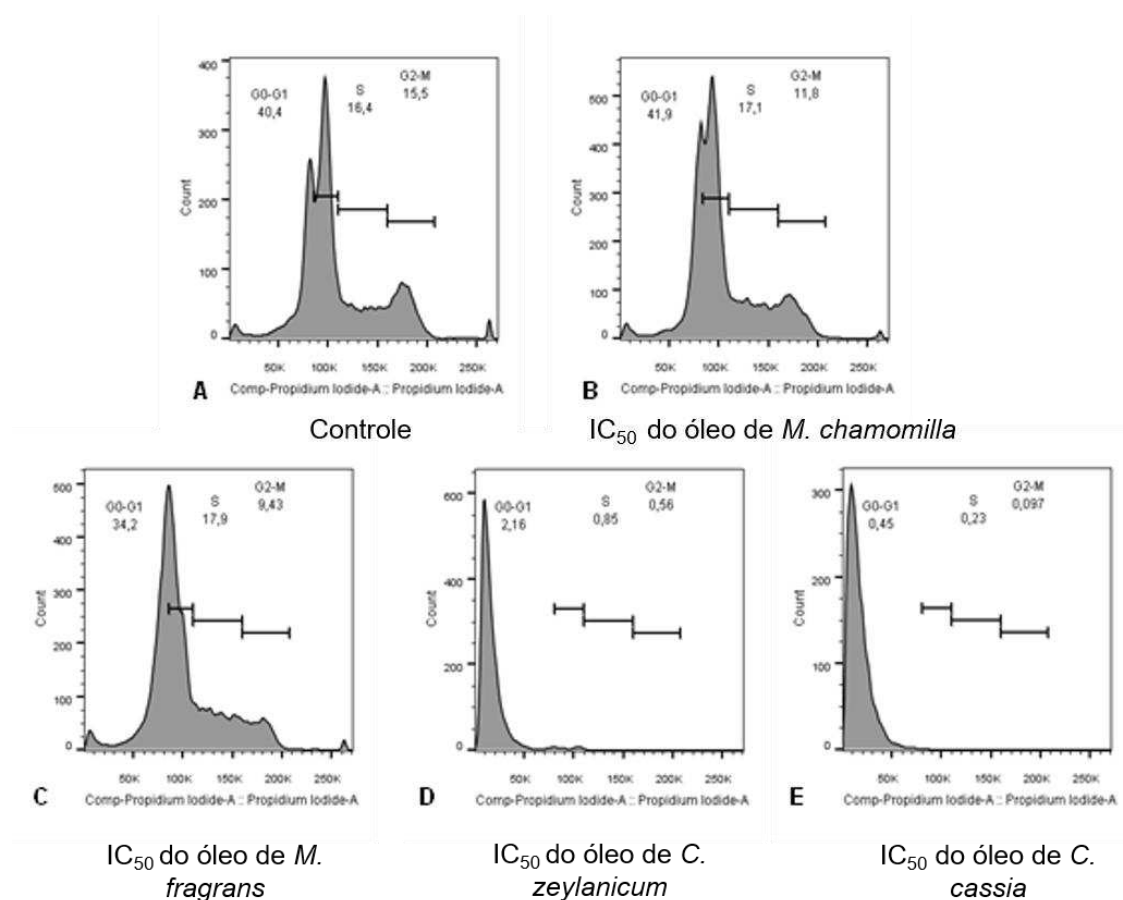


As células SW480 foram tratadas com a IC_{50} dos OEs de *Matricaria chamomilla*, *Myristica fragrans*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum zeylanicum*. A distribuição percentual de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose foi quantificada por citometria de fluxo após dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio. As barras representam a média dos percentuais de cada população celular.

4.4. Análise do ciclo celular

Para avaliar se o tratamento com os OEs interfere no controle do ciclo celular, realizou-se ensaios de quantificação de DNA no interior das células por citometria de fluxo. A atividade do ciclo celular da linhagem HepG2 e da linhagem SW480 após 48h de tratamento com a IC₅₀ dos OEs estão representadas nas figuras 24-25 e 26-27, respectivamente.

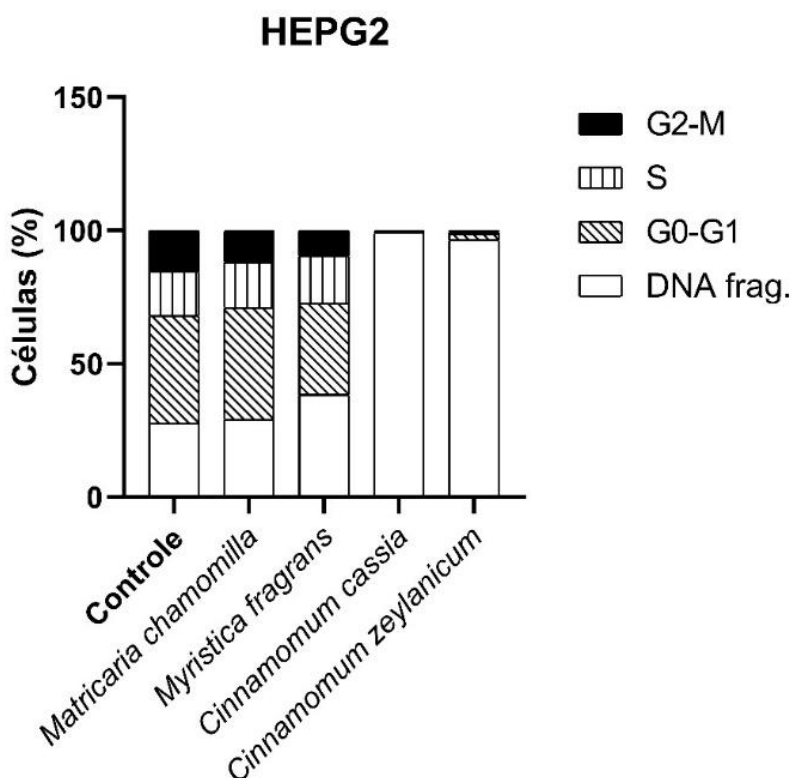
Figura 24 – Histogramas representativos do ciclo celular de células HepG2 tratadas com OEs



Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo após tratamento por 48h com a concentração IC₅₀ de diferentes óleos. (A) Controle (células não tratadas); (B) Óleo de *Matricaria chamomilla*; (C) Óleo de *Myristica fragrans*; (D) Óleo de *Cinnamomum zeylanicum*; (E) Óleo de *Cinnamomum cassia*. Os marcadores indicam as populações celulares nas fases G0/G1, S e G2/M.

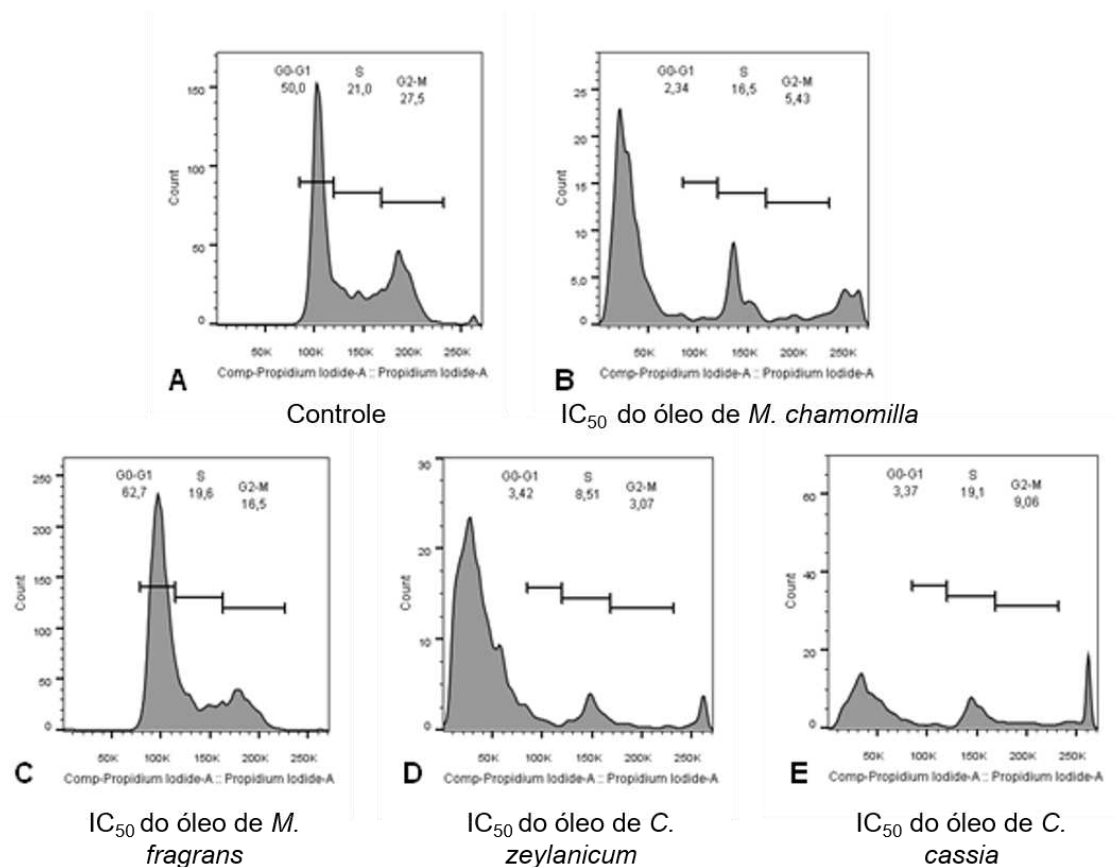
A análise do ciclo celular por citometria de fluxo revelou diferentes perfis de morte celular. O grupo controle (A) apresentou um ciclo celular normal. A maioria das células está em G0/G1 (40,4%), com populações ativamente proliferando nas fases S (16,4%) e G2/M (15,5%). O pico sub-G1 (G0-01) é insignificante. O tratamento com o óleo de *M. chamomilla* (B) induziu um aumento acentuado da população em sub-G1 (41,9%), indicando forte indução de apoptose. De forma similar, o óleo de *M. fragrans* (C) também aumentou a fração de células em sub-G1 (34,2%), mas com um discreto acúmulo de células em fase S (17,9%), sugerindo uma possível dificuldade na progressão desta fase. Já os óleos de *C. cassia* e *C. zeylanicum* (D e E) demonstraram citotoxicidade severa, causando um colapso do ciclo celular, com o desaparecimento quase total das fases S e G2/M e um acúmulo massivo de células na região sub-G1, corroborando os dados de apoptose.

Figura 25 – Distribuição das fases do ciclo celular em células HepG2 tratadas com OEs.



Quantificação da porcentagem de células nas fases G0/G1, S, G2/M e com DNA fragmentado (Sub-G1) após tratamento por 48h com a concentração da IC₅₀ de cada óleo.

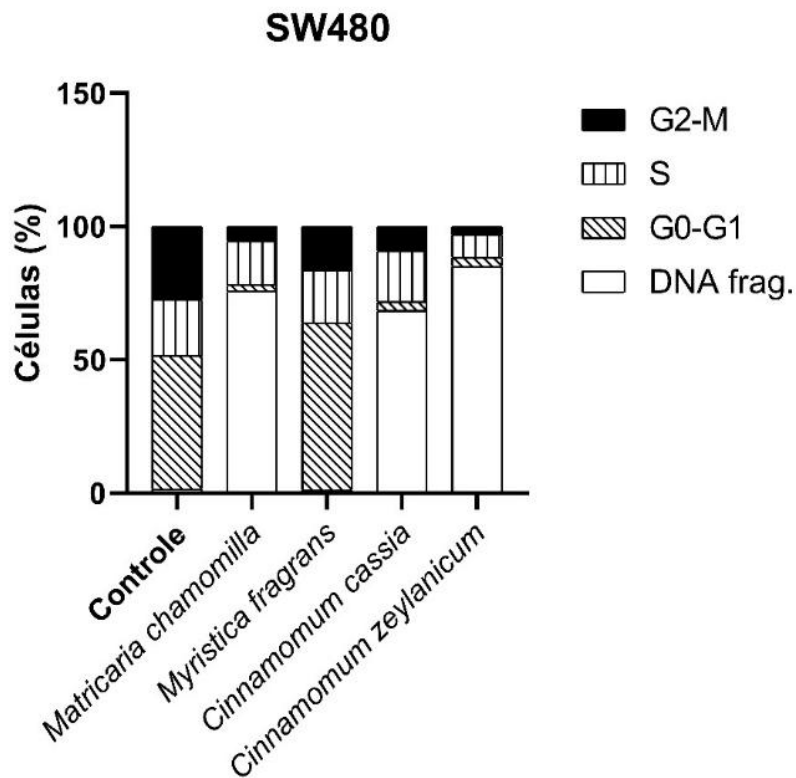
Figura 26 – Histogramas representativos do ciclo celular de células SW480 tratadas com OEs



Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo após tratamento por 48h com a concentração IC₅₀ de diferentes óleos. **(A)** Controle (células não tratadas); **(B)** Óleo de *Matricaria chamomilla*; **(C)** Óleo de *Myristica fragrans*; **(D)** Óleo de *Cinnamomum zeylanicum*; **(E)** Óleo de *Cinnamomum cassia*. Os marcadores indicam as populações celulares nas fases G0/G1, S e G2/M.

A análise do ciclo celular da linhagem SW480 revelou diferentes mecanismos de ação. O grupo controle (A) apresentou um perfil de proliferação normal. O tratamento com óleo de *M. fragrans* (C) induziu uma clara parada do ciclo celular na fase G0/G1, evidenciada pelo aumento da população de células nesta fase (62,7%) em comparação ao controle (50,0%), e uma subsequente redução das fases S e G2/M, sem indução de morte celular (ausência de pico sub-G1). Em contraste, os óleos de *M. chamomilla* (B) e os óleos de *C. cassia* e *C. zeylanicum* (D e E) mostraram um perfil de alta citotoxicidade. Estes tratamentos causaram um colapso dos picos do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) e o surgimento de um pico sub-G1 predominante, indicando morte celular massiva por fragmentação do DNA.

Figura 27 – Distribuição das fases do ciclo celular em células SW480 tratadas com OEs.



Quantificação da porcentagem de células nas fases G0/G1, S, G2/M e com DNA fragmentado (Sub-G1) após tratamento por 48h com a concentração da IC₅₀ de cada óleo.

5. DISCUSSÃO

A busca por novas terapias antineoplásicas mais eficazes e com menor toxicidade é a maior preocupação da pesquisa oncológica moderna. O presente estudo demonstrou que os OEs de *Matricaria chamomilla*, *Myristica fragrans*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum zeylanicum* não apenas exibem potente atividade citotóxica contra linhagens de carcinoma hepatocelular, câncer de mama e colorretal, mas o fazem com notável seletividade para as células tumorais. A capacidade de induzir a morte celular programada (apoptose) somada aos altos índices de seletividade, posicionam estes óleos, como fontes promissoras para o desenvolvimento de novos fitoterápicos no combate ao câncer.

A elucidação da composição química dos OEs por CG-EM é um passo crucial para a interpretação de seus efeitos biológicos, permitindo a correlação entre os constituintes majoritários e a atividade antitumoral observada nos ensaios. Cada óleo apresentou um perfil químico distinto, cujos principais componentes possuem atividades já bem documentadas na literatura, o que fortalece e ajuda a explicar os resultados aqui encontrados.

No caso do óleo de *Matricaria chamomilla*, a análise revelou que os compostos majoritários eram os sesquiterpenos oxigenados: Óxido de Bisabolol B (21,5%) e Óxido de Bisabolol A (18,3%). A literatura respalda fortemente a atividade biológica destes compostos. Sendo produtos de oxidação do α -bisabolol, eles herdam e modificam sua funcionalidade. Estudos prévios já demonstraram que o óxido de bisabolol A possui efeito citotóxico e pró-apoptótico em timócitos de ratos (OGATA *et al.*, 2010) e a capacidade de inibir a migração de células de câncer colorretal (SHAABAN *et al.*, 2021) através da inibição de vias angiogênicas. Considerando que nosso estudo demonstrou que este óleo foi um potente indutor de apoptose, especialmente na linhagem de hepatocarcinoma, é provável que esses sesquiterpenos oxigenados sejam os principais mediadores destes efeitos.

A avaliação da potência citotóxica revelou uma sensibilidade variável das linhagens celulares aos diferentes óleos. O óleo de *M. chamomilla* apresentou

maior potência citotóxica contra HepG2, com uma IC_{50} de 5,5 $\mu\text{g/mL}$. Este valor é menor que o encontrado por Al-Dabbagh *et al.* (2019) para o extrato etanólico de camomila (aprox. 300 $\mu\text{g/mL}$). Essa expressiva diferença pode ser atribuída à seletividade do método de extração: enquanto a extração com solvente resulta em uma fitoquímica complexa e diluída por compostos inativos (como açúcares e clorofila), a hidrodestilação concentra uma fração quase pura de metabólitos secundários voláteis e lipofílicos. Essa lipofilicidade inerente aos constituintes do OE potencializa sua ação por facilitar a penetração na membrana plasmática das células cancerígenas (RUSSO *et al.*, 2015). Além disso, o método de hidrodestilação representa uma concentração muito maior de princípios ativos por micrograma em comparação ao extrato bruto.

Este perfil se traduziu em um elevado Índice de Seletividade (IS) contra o hepatocarcinoma (Tabela 9), com IS de 77,4 (VERO/HepG2) e 44,01 (BGM/HepG2). Isso significa que, para cada célula não tumoral afetada, mais de 77 células de hepatocarcinoma são eliminadas.

Em contraste, o óleo foi menos potente contra a linhagem de câncer de mama MCF-7 (IC_{50} = 89,72 $\mu\text{g/mL}$) e câncer colorretal SW480 (IC_{50} = 93,13 $\mu\text{g/mL}$). A baixa atividade contra SW480 é esperada, pois a literatura atribui a atividade anticolorretal da camomila ao flavonoide não volátil apigenina (Xu *et al.*, 2016), que não é extraído pela hidrodestilação.

Para o óleo de *Myristica fragrans*, a análise revelou um perfil químico rico no fenilpropanoide miristicina (15,65%) e nos monoterpenos sabineno (22,89%), α -pineno (12,46%) e β -pineno (10,69%), uma composição consistente com a reportada por Piras *et al.* (2012). A miristicina é amplamente reconhecida na literatura por sua robusta atividade antitumoral (BAO & MUGE, 2021; NAZAR & AYYAPPAN, 2024), incluindo a indução de apoptose em células de hepatocarcinoma (MARABINI *et al.*, 2017).

O óleo de noz-moscada exibiu seu melhor desempenho contra a linhagem de câncer de mama MCF-7 (IC_{50} = 23,14 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 6), uma ação consideravelmente mais potente que a reportada por Piaru *et al.* (2011) (66,45 $\mu\text{g/mL}$). Foi menos potente contra SW480 (IC_{50} = 192,2 $\mu\text{g/mL}$) e HepG2 (IC_{50} = 203,5 $\mu\text{g/mL}$). A potente citotoxicidade na MCF-7 resultou em uma alta

seletividade para o câncer de mama, com um IS de 13,16 (BGM/MCF-7) (Tabela 9), validando-o como um alvo prioritário para estudos futuros nesta neoplasia.

Por fim, a potente e generalizada atividade citotóxica dos óleos de canela pode ser diretamente associada à sua elevada concentração de trans-cinamaldeído, que correspondeu a 91,3% no óleo de *C. cassia* e 68,9% no óleo de *C. zeylanicum*. Este aldeído é um dos compostos de origem natural mais estudados por seu potencial antineoplásico, com eficácia demonstrada na inibição da proliferação, invasão e indução de apoptose em linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231) com $IC_{50} = 12,23 \mu\text{g/ml}$ (LIU *et al.*, 2020), fígado (HepG2), com $IC_{50} = 9,76 \mu\text{M}$ (NG & WU, 2011) e colorretal (SW480) com $IC_{50} = 35,69 \mu\text{g/ml}$ (LI *et al.*, 2016), através da modulação de vias críticas como a PI3K/AKT. Adicionalmente, a predominância de linalol (5,3%) no óleo de *C. zeylanicum* agrega outra camada de atividade, pois este composto demonstrou potencializar a ação de quimioterápicos convencionais (RAVIZZA *et al.*, 2008).

Estes óleos de canela foram potentes em todas as linhagens testadas (Tabelas 7 e 8). Na HepG2, *C. cassia* foi o mais potente de todos os óleos testados ($IC_{50} = 3,15 \mu\text{g/mL}$). Na MCF-7, *C. zeylanicum* foi o mais ativo ($IC_{50} = 8,84 \mu\text{g/mL}$). No câncer colorretal, *C. zeylanicum* também liderou ($IC_{50} = 15,27 \mu\text{g/mL}$), e o valor de *C. cassia* ($40,21 \mu\text{g/mL}$) foi muito próximo ao do cinamaldeído puro ($35,69 \mu\text{g/ml}$) reportado por Li *et al.* (2016). Estes óleos também apresentaram perfis de seletividade favoráveis, superando os *benchmarks* clínicos em diversas situações, como *C. cassia* na HepG2 (IS=10,24; BGM/HepG2) e *C. zeylanicum* na MCF-7 (IS=8,84; BGM/MCF-7) (Tabela 9).

A avaliação da citotoxicidade em células não-tumorais é determinante para o cálculo do Índice de Seletividade (IS) e para a garantia da segurança farmacológica dos compostos testados (INDRAYANTO *et al.* 2021). Para mitigar vieses associados à heterogeneidade intrínseca de modelos *in vitro* (BEN-DAVID *et al.*, 2018), optou-se pela utilização de duas linhagens renais distintas de *Chlorocebus sabaeus*: VERO (ATCC CCL-81™) e BGM (CVCL_4125). Embora compartilhem a mesma origem tecidual, estas linhagens constituem

sistemas biológicos independentes, moldados por histórias distintas de deriva genética e adaptação à cultura.

A linhagem VERO, especificamente, apresenta uma deleção cromossômica espontânea bem caracterizada que resulta na deficiência da produção de interferons do tipo I (IFN-I) e na perda de genes reguladores do ciclo celular, como o *locus* CDKN2A/B (OSADA *et al.*, 2014). Essa característica genética confere à VERO um perfil de resistência à parada do ciclo celular sob estresse químico, potencialmente alterando sua sensibilidade a fármacos (KONISHI *et al.* 2022). Em contrapartida, a linhagem BGM — estabelecida independentemente e reconhecida por sua distinta suscetibilidade viral e permeabilidade de membrana (BARRON *et al.*, 1970) — atua como um controle complementar de robustez.

Variações de sensibilidade entre as linhagens evidenciam polimorfismos em farmacogenes e taxas proliferativas distintas. A validação cruzada entre VERO e BGM elimina, portanto, vieses de linhagem única, assegurando que a citotoxicidade observada não é um artefato clonal, mas uma resposta biológica consistente.

Ao buscar estratégias de tratamento eficazes contra o câncer, espera-se encontrar um fármaco que induza a morte seletiva de células tumorais e mantenha a integridade das células normais do organismo. Nesse sentido, os mecanismos e as vias que regulam o tipo de morte celular são fundamentais para escolha da terapia adequada.

A morte celular por apoptose representa uma via especialmente eficiente como alvo de tratamentos para tumores, já que ao contrário da morte celular por necrose, a apoptose mantém a integridade da membrana, e assim, as células não liberam seus conteúdos intracelulares. Além disso, quando as células apoptóticas são ingeridas por fagócitos, elas estimulam os mesmos a produzirem citocinas anti-inflamatórias. Enquanto as células que sofrem morte celular por necrose, perdem a integridade da membrana e vazam seus componentes intracelulares, alguns dos quais servem como sinais que estimulam a inflamação, podendo causar um aumento da agressividade do tumor (ROCK & KONO, 2008).

O valor de IC₅₀ foi obtido a partir do ensaio de MTT. O MTT não mede morte celular diretamente. Ele mede a viabilidade metabólica (a capacidade da mitocôndria de reduzir o sal de tetrazólio). Uma queda de 50% de células viáveis no MTT pode significar duas coisas: 1- Efeito Citotóxico: 50% das células morreram e pararam de metabolizar, ou 2- Efeito Citoestático: 100% das células estão vivas, mas 50% delas pararam de proliferar (parada do ciclo celular) e diminuíram seu metabolismo. O ensaio por Citometria de Fluxo mede Anexina/PI, ou seja, morte celular de forma explícita, separando células vivas, apoptóticas e necróticas.

Nesse sentido, ao analisar a linhagem HepG2, onde o resultado do tratamento com a IC₅₀ do OE de *M. chamomilla* gerado pelo ensaio de MTT causou morte celular por apoptose de apenas 28,17% de células, sugere fortemente que esse OE, nesta dose, tem um efeito primariamente citoestático. Ele inibiu a proliferação (fazendo o MTT cair 50%), mas não matou todas as células que pararam de crescer. O tratamento com o OE de *M. fragrans* com o valor da IC₅₀ por MTT levou 59,1% de morte por apoptose. Estes valores estão muito próximos, o que sugere que o óleo de *M. fragrans* tem um efeito primariamente citotóxico. A queda na viabilidade do MTT foi, de fato, causada pela morte celular.

Quanto ao tratamento com as duas espécies de canela, *Cinamomum zeylanicum* e *Cinamomum cassia*, o valor da IC₅₀ (de acordo com o MTT) levou à morte por apoptose de ~99,8%. Isso indica um efeito altamente citotóxico com uma curva de dose-resposta muito íngreme. A concentração que inibiu 50% do metabolismo no ensaio de MTT foi, na verdade, letal para quase 100% da população celular no período de 48h. Portanto, mecanisticamente, para HepG2, o OE da *M. chamomilla* tem efeito citoestático, enquanto os OEs de *M. fragrans*, *Cinamomum zeylanicum* e *Cinamomum cassia* são puramente citotóxicos.

Da mesma forma, ao analisar a linhagem SW480, observamos que o tratamento com a IC₅₀ do MTT de *M. chamomilla* e *M. fragrans* sugeriu uma queda de 50% na viabilidade metabólica. No entanto, a população de células viáveis no ensaio de apoptose por citometria de fluxo permaneceu alta (62,7% e 74,6%, respectivamente). Isso indica que o efeito principal desses óleos nesta linhagem é fortemente citoestático: eles fazem a célula parar de proliferar (ou diminuir o metabolismo), o que causa a queda no sinal do MTT, mas não as

matam efetivamente. E com relação ao tratamento com os OEs de *C. cassia* e *C. zeylanicum*, novamente, vemos um "efeito penhasco". A concentração que inibiu 50% do metabolismo no MTT foi, na verdade, letal para ~99% da população celular. A diferença principal dos tratamentos com OEs nas duas linhagens celulares está no mecanismo de morte: enquanto na HepG2 a morte foi predominantemente por apoptose (sendo mais vantajoso, ao evitar inflamação por ruptura da membrana e liberação do conteúdo intracelular), na linhagem SW480 a morte é massivamente necrótica, especialmente para *C. zeylanicum* (60,1% de necrose). Isso sugere que os óleos de canela ativam diferentes vias de morte dependendo do tipo celular.

Em síntese, os resultados indicam que a apoptose é a via de morte predominante na HepG2, enquanto na SW480 a resposta é mista, sugerindo uma dependência do tipo de tumor. O estudo demonstrou que óleos com perfis químicos distintos (sesquiterpenos, monoterpenos e fenilpropanoides) possuem mecanismos de ação variados (citoestático vs. citotóxico) e alvos celulares preferenciais (HepG2 vs. MCF-7).

Como limitações, este estudo foi conduzido *in vitro*, e a eficácia dos OEs pode ser alterada *in vivo* por fatores farmacocinéticos. Além disso, a complexa mistura de compostos nos óleos pode gerar tanto efeitos sinérgicos quanto antagônicos. As perspectivas, portanto, incluem a avaliação dos óleos mais promissores (*M. chamomilla* e *M. fragrans*) em modelos animais para os respectivos tipos de câncer. Adicionalmente, o fracionamento bio-guiado para isolar os compostos responsáveis pela alta seletividade e o estudo de terapias combinadas com quimioterápicos, representam caminhos promissores para traduzir estes achados em aplicações clínicas.

6. CONCLUSÃO

Neste capítulo, demonstrou-se que os OEs de *Matricaria chamomilla*, *Myristica fragrans*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum zeylanicum* possuem atividades anticancerígenas promissoras *in vitro*. Os resultados indicam que os óleos inibem a proliferação celular e induzem a apoptose em linhagens de câncer de mama, colorretal e carcinoma hepatocelular.

Estes achados corroboram o crescente corpo de evidências sobre o potencial dos OEs como fonte de novas moléculas com atividade antitumoral. Contudo, é fundamental ressaltar que os resultados foram obtidos em modelos *in vitro*, sendo um passo inicial na longa jornada de desenvolvimento de um novo fármaco.

A progressão desta investigação exigirá uma abordagem multifacetada para transpor a lacuna entre os achados *in vitro* e a aplicação clínica. Primeiramente, é fundamental aprofundar a compreensão em nível molecular, através do isolamento dos compostos bioativos e da elucidação de seus mecanismos de ação específicos. Concomitantemente, para otimizar a terapia, pode ser explorado o encapsulamento desses óleos ou de seus compostos isolados em sistemas carreadores, como lipossomas e nanoemulsões, a fim de aumentar a seletividade tumoral. Por fim, a validação da eficácia e da segurança em modelos animais *in vivo*, aliada a ensaios farmacocinéticos, constitui a etapa pré-clínica indispensável que poderá consolidar a evidência necessária para justificar futuros ensaios clínicos.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. (2017); ed. 4.1, ISBN 978-1-932633-21-4.

ALAM, A. *et al.* Antioxidant, Antibacterial, and Anticancer Activity of Ultrasonic Nanoemulsion of *Cinnamomum Cassia* L. **Essential Oil. Plants**. (2023); v. 12, n. 4, p. 834. doi:10.3390/plants12040834

AL-DABBAGH, B, *et al.* Antioxidant and anticancer activities of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **BMC Research Notes**. (2019), v. 12, p. 3. doi: 10.1186/s13104-018-3960-y. doi.org/10.1186/s13104-018-3960-y

ALIYAH, A. N. *et al.* Cinnamon oil as a co-chemotherapy agent through inhibition of cell migration and MMP-9 expression on 4T1 cells, **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, (2022), v. 19, n. 4, p. 921-928. doi:10.1515/jcim-2020-0165

ALUM, E. U. *et al.* Endogenous Plant signals and human Health: Molecular mechanisms, ecological functions, and therapeutic Prospects, **Biochemistry and Biophysics Reports**, (2025), v. 43, ISSN 2405-5808, doi:10.1016/j.bbrep.2025.102114.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, (2008), v. 46, n. 2, p. 446-475, doi:10.1016/j.fct.2007.09.106

BANERJEE S.; BANERJEE S. Anticancer Potential and Molecular Mechanisms of Cinnamaldehyde and Its Congeners Present in the Cinnamon Plant. **Physiologia**, (2023), v. 3, n. 2, p. 173-207. doi:10.3390/physiologia3020013

BAO, H., & MUGE, Q. Anticancer effect of myristicin on hepatic carcinoma and related molecular mechanism. **Pharmaceutical biology**, (2021). v. 59, n. 1, p. 1126–1132. doi:10.1080/13880209.2021.1961825

BARRON, A.L., OLSHEVSKY, C. & COHEN, M.M. Characteristics of the BGM line of cells from African green monkey kidney. **Archives of Virology**, (1970), v. 32, p. 389–392, doi:10.1007/BF01250067

BAYALA B. *et al.* Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Activities of Essential Oils of Plants from Burkina Faso. **PLoS ONE**, (2014), v. 9, n. 3, e92122. doi:10.1371/journal.pone.0092122

BEN-DAVID, U. *et al.* Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. **Nature**, (2018), v. 560, p. 325–330, doi:10.1038/s41586-018-0409-3

BEZERRA, S.B. *et al.* Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and K⁺ ATP channels. **Journal Medical Food**. (2009), v. 12, n. 6, p.1403–1406.

BHALLA, Y; GUPTA, V. K. JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, (2013), v. 93, p.3643-3653. doi:10.1002/jsfa.6267

BRATTY, M. A. *et al.* High performance thin-layer chromatography and in vitro cytotoxic studies on ethanol extract of *Matricaria chamomilla* L (Asteraceae) Flowers. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. (2019), v.18, n. 9, p. 1969-1976. doi:10.4314/tjpr.v18i9.27

CAVALIERI, E., *et al.* Involvement of microbial permeability transition pore opening in alpha-bisabolol induced apoptosis. **The FEBS Journal**, (2009), v. 276, n. 1, p. 3990-4000.

CAVALIERI, E., *et al.* α - Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. (2004) n. 315, v. 3, p. 589-594.

CHAACHOUAY, N.; ZIDANE, L. Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development. **Drugs and Drug Candidates**. (2024), v. 3, n. 1, p. 184-207. doi:10.3390/ddc3010011

CHATTERJEE, S. *et al.* Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*). **Food Chemistry**. (2007), v. 101, n. 2, p. 515-523. doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.008

CHAUHAN, R. *et al.* A Comprehensive Review on Biology, Genetic Improvement, Agro and Process Technology of German Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). (2022). **Plants**, v.11, n.1, p. 29. doi:10.3390/plants11010029

CRAGG, G. M., & Newman, D. J. Natural product drug discovery in the next millennium. **Pharmaceutical Biology**, (2001). v. 39, p. 8–17. doi:10.1076/phbi.39.s1.8.0009

CVETANOVIĆ, A. *et al.* Antioxidant and biological activity of chamomile extracts obtained by different techniques: perspective of using superheated water for isolation of biologically active compounds. **Industrial Crops and Products**, (2015), v. 65, p. 582-591. doi:10.1016/j.indcrop.2014.09.044

DAI, Y. *et al.* Chamomile: A Review of Its Traditional Uses, Chemical Constituents, Pharmacological Activities and Quality Control Studies. **Molecules**, (2022). v. 28, n. 1, p. 133. doi:10.3390/molecules28010133

DANESHVAR, S. *et al.* A comprehensive view on the apigenin impact on colorectal cancer: Focusing on cellular and molecular mechanisms. **Food science & nutrition**, (2023), v. 11, n.11, p. 6789–6801. doi:10.1002/fsn3.3645

DARZYNKIEWICZ, Z.; HALICKA, H. D.; ZHAO, H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2010. v. 676; p. 137–147.

DE SILVA, D. A. M., *et al.* Clean vs dirty labels: Transparency and authenticity of the labels of Ceylon cinnamon. **PloS one**, (2021), v.16, n.11, e0260474. doi:10.1371/journal.pone.0260474

DE SOUSA, D. P., *et al.* Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. **Biomolecules**, (2023). v. 13, n. 7, p. 1144. doi:10.3390/biom13071144

DONG, K. *et al.* Cinnamaldehyde and Doxorubicin Co-Loaded Graphene Oxide Wrapped Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced MCF-7 Cell Apoptosis. **International Journal of Nanomedicine**. (2020), v. 15, p. 10285–10304. doi:10.2147/IJN.S283981

DUARTE, D., NUNES, M., RICARDO, S., & VALE, N. (2022). Combination of Antimalarial and CNS Drugs with Antineoplastic Agents in MCF-7 Breast and HT-29 Colon Cancer Cells: Biosafety Evaluation and Mechanism of Action. **Biomolecules**, v. 12, n. 10, p. 1490. doi:10.3390/biom12101490

DUTTA, A.; CHAKRABORTY, A. Cinnamon in Anticancer Armamentarium: A Molecular Approach. **Journal of Toxicology**, (2018), 8978731, doi:10.1155/2018/8978731

FERREIRA E. I. Planejamento de Fármacos na Área de Doença de Chagas: Avanços e Desafios. **Revista Virtual Química**, (2012). v.4, n.3, p.225-46. doi: 10.5935/1984-6835.20120019

FITSIOU, E.; PAPPA, A. Anticancer Activity of Essential Oils and Other Extracts from Aromatic Plants Grown in Greece. **Antioxidants**, (2019); v. 8, n. 8, p. 290. doi:10.3390/antiox8080290

GAYNES R. The Discovery of Penicillin – New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. **Emerging Infectious Diseases**, (2017). v. 23, n. 5, p. 849–853. doi:10.3201/eid2305.161556

GINTING B, *et al.* Evaluation of Antioxidant and Anticancer Activity of *Myristica fragrans* Hoult. **Pharmacognosy Journal**, (2021), v.13, n. 3, p. 780-6. doi: 10.5530/pj.2021.13.99

GUNAWARDENA, D. *et al.* Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts - identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. **Food & function** (2015), v. 6, n. 3, p. 910-9. doi:10.1039/c4fo00680a

GUPTA, A. K.; MISRA, N. Hepatoprotective activity of aqueous ethanolic extract of Chamomile capitula in paracetamol intoxicated albino rats. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, (2006), v.1, n.1, p.17-20. doi:10.5555/20073112647

HARIPRIYA, D. *et al.* Immunomodulatory and Apoptotic Effect of Cinnamaldehyde in HepG2 Cells. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. (2023), v. 13, n.4, doi:10.33263/BRIAC134.320

HOLOHAN, C., VAN SCHAEYBROECK, S., LONGLEY, D. *et al.* Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**. v. 13, p. 714–726 (2013). doi: 10.1038/nrc3599

HOUSMAN, G. *et al.* Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers**. (2014); v. 6, n. 3, p. 1769-1792. doi:10.3390/cancers6031769

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. Chapter Six - Validation of *in-vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research, (2021), **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 46, p. 273-307, ISSN 1871-5125, ISBN 9780128241271, doi:10.1016/bs.podrm.2020.07.005.

ISHFAQ, P.M. *et al.* Biochemical and pharmacological applications of essential oils in human health especially in cancer prevention. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, (2018), v. 18, n. 13, p.1815-1827. doi:10.2174/1871520618666181002130240

JARDIM, I.N. *et al.* (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. **Journal of Pest Science**, (2018), v. 91, p. 479–487. doi:10.1007/s10340-017-0850-3

JOUMAA, E. *et al.* Protective effect of Matricaria chamomilla extract against 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal cancer in mice. **Journal of complementary & integrative medicine**. (2020), v.17, n.3 doi:10.1515/jcim-2019-0143

KATIYAR, C.; GUPTA, A.; KANJILAL, S.; KATIYAR, S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. **Ayu**, (2012), v. 33, n. 1, p. 10–19. doi:10.4103/0974-8520.100295

KATO, A. *et al.* Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. (2008), v.56, n. 17, p. 8206-8211. doi:10.1021/jf8014365

KHAMNUAN, S., *et al.* The Identification and Cytotoxic Evaluation of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) and Its Substituents. **Foods**, (2023), v. 12, n. 23, p. 4211. doi:10.3390/foods12234211

KHAN, A. *et al.* Plant Secondary Metabolites-Central Regulators Against Abiotic and Biotic Stresses. **Metabolites**, (2025). v. 15, n. 4, p. 276. doi:10.3390/metabo15040276

KONISHI, K. *et al.* Whole-Genome Sequencing of Vero E6 (VERO C1008) and Comparative Analysis of Four Vero Cell Sublines, **Frontiers in Genetics**, (2022), v. 13, doi:10.3389/fgene.2022.801382

KUBATKA P. *et al.* Chemopreventive and Therapeutic Efficacy of *Cinnamomum zeylanicum* L. Bark in Experimental Breast Carcinoma: Mechanistic *In Vivo* and *In Vitro* Analyses. **Molecules**. (2020), v. 25, n. 6, p. 1399. doi:10.3390/molecules25061399

KUCHTA, K. *et al.* Which East Asian herbal medicines can decrease viral infections? **Phytochemistry Reviews**, (2022), v. 21, p. 219-237. doi:10.1007/s11101-021-09756-2

KWON, HK. *et al.* Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NFκB and AP1. **BMC Cancer** (2010), v. 10, p. 392. doi:10.1186/1471-2407-10-392

LAN, W. *et al.* Study on the effect of Uygur chamomile on inhibiting the proliferation of cervical cancer Hela cells *in vitro*. **Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine**. (2016), v. 37, p. 54–55. doi:10.16254/j.cnki.53-1120/r.2016.05.028.

LE, T.V.T. *et al.* Diarylbutane-type lignans from *Myristica fragrans* (Nutmeg) show the cytotoxicity against breast cancer cells through activation of AMP-activated protein kinase. **Natural Product Sciences**, (2017), v. 23, n.1, p. 21-28. doi:10.20307/nps.2017.23.1.21

LESGARDS, J.F. *et al.* Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. **Phytotherapy Research**, (2014), v. 28, p.1423-1446. doi: 10.1002/ptr.5165.

LI, F. *et al.* Modulation of colon cancer by nutmeg. **Journal of proteome research**, (2015). v. 14, n. 4, p. 1937–1946. doi:10.1021/pr5013152

LI, J. *et al.* Cinnamaldehyde affects the biological behavior of human colorectal cancer cells and induces apoptosis via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. **Oncology Reports**, (2016), v.35, p. 1501-1510. doi:10.3892/or.2015.4493

LIU, Y. *et al.* Targets and Mechanism Used by Cinnamaldehyde, the Main Active Ingredient in Cinnamon, in the Treatment of Breast Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, (2020), v. 11. doi:10.3389/fphar.2020.582719

LUMIPROBE. Annexin V-AF488 apoptosis detection kit. 2025. Disponível em: <https://www.lumiprobe.com/k/annexin-V-af488-fitc-kit>. Acesso em: 26 ago. 2025

MARABINI, L. *et al.* Assessment of Toxicity of Myristicin and 1'-Hydroxymyristicin in HepG2 Cell Line. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, (2017), v. 12, p. 170–179. doi: 10.3923/jpt.2017.170.179.

MATHUR, SUNIL, CLARE HOSKINS. Drug development: Lessons from nature. **Biomedical reports**. (2017), p v. 6, n.6, p. 612-614. doi:10.3892/br.2017.909

MORAES, A. O. *et al.* Quimioembolização arterial transcateter de carcinoma hepatocelular em paciente com oclusão de tronco celíaco: um desafio terapêutico. **Jornal Vascular Brasileiro**. (2019), v. 18, e20180090. doi:10.1590/1677-5449.180090

NACALAI TESQUE. Annexin V Apoptosis Detection. 2025. Disponível em: <https://www.nacalai.com/global/reagent/research/annexin.html>. Acesso em: 26 ago. 2025.

NAPONELLI, V.; ROCCHETTI, M. T.; MANGIERI, D. Apigenin: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential against Cancer Spreading. **International Journal of Molecular Sciences**, (2024), v. 25, n. 10, p. 5569. doi:10.3390/ijms25105569

NAVEEN, R. & KANDASAMY, S. A review on the encapsulation of bioactive components using spray-drying and freeze-drying techniques, **Journal of Food Process Engineering**, (2022), v. 45, n. 8, e14059, doi:10.1111/jfpe.14059

NAZAR, S. S. & AYYAPPAN, J. P. Mechanistic evaluation of myristicin on apoptosis and cell cycle regulation in breast cancer cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, (2024), v. 38, n; 6, e23740, doi: 10.1002/jbt.23740

NG, L.; WU, S. Antiproliferative Activity of Cinnamomum cassia Constituents and Effects of Pifithrin-Alpha on Their Apoptotic Signaling Pathways in Hep G2 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, (2011), 492148, doi:10.1093/ecam/nep220

NIKSERESHT, M. *et al.* The Hydroalcoholic Extract of *Matricaria chamomilla* Suppresses Migration and Invasion of Human Breast Cancer MDA-MB-468 and MCF-7 Cell Lines. **Pharmacognosy Research**, (2017), v. 9, p. 87–95. doi: 10.4103/0974-8490.199778.

NOBLE R. L. The discovery of the vinca alkaloids – chemotherapeutic agents against cancer. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, (1990), v. 68, n. 12, p. 1344–1351.

NOVÁKOVÁ, L. *et al.* Development and application of UHPLC–MS/MS method for the determination of phenolic compounds in Chamomile flowers and Chamomile tea extracts. **Talanta**, (2010), v. 82, n. 4, p.1271-128. doi:10.1016/j.talanta.2010.06.057

NUNES, C.R. *et al.* (2021) Chemical composition and antifungal activity of *Thymus Vulgaris* essential oil on *Aspergillus Niger*, *Penicillium Expansum*, *Sclerotinia Sclerotiorum* and *Sclerotium Rolfsii*. **Brazilian Journal of Development**, (2021), v.7, n.2, p.14250-14260. doi:10.34117/bjdv7n2-173

OGATA, I. *et al.* Bisabololoxide A, one of the main constituents in German chamomile extract, induces apoptosis in rat thymocytes. **Archive Toxicology**, (2010). v. 84, p. 45–52.

OSADA, N. *et al.* The Genome Landscape of the African green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. **DNA Research**, (2014). v. 21, n. 6, p. 673-683, doi:10.1093/dnares/dsu029

OU, M. *et al.* Mechanism of Apigenin against breast cancer stem cells: network pharmacology and experimental validation. **Frontiers in Pharmacology**, (2024), v. 15 doc:10.3389/fphar.2024.1496664

PARIKH, K. P. **Gemini Surfactans synthesis, physicochemical properties and applications**. 2016. Thesis (Ph Doctoral dissertation). Maharaja Sayajirao University of Baroda. Department of Chemistry. Baroda, 2016. Available in: <http://hdl.handle.net/10603/133143>

PIARU, S. P. *et al.* Chemical composition, antioxidant and cytotoxicity activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, (2011), v. 92, n. 3, p. 593–597. doi:10.1002/jsfa.4613

PIRAS, A. *et al.* Extraction and Separation of Volatile and Fixed Oils from Seeds of *Myristica fragrans* by Supercritical CO₂: Chemical Composition and Cytotoxic Activity on Caco-2 Cancer Cells. **Journal of Food Science**, (2012), v. 77, n. 4, C448–C453. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02618.x

RAO, P. V. & GAN, S. H. Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, (2014). n. 642942. doi:10.1155/2014/642942

RAVIZZA, R. *et al.* Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. **Oncology Reports**, (2008), n. 20, p. 625-630. doi:10.3892/or_00000051

ROCK, K. L. & KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual review of pathology**, (2008), v. 3, p. 99–126. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456

RUSSO, R. *et al.* Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, (2015). eCAM, 397821. doi:10.1155/2015/397821

SADEGHI, S. *et al.* Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects, **European Journal of Medicinal Chemistry**, (2019) v.178, p. 131-140

SADGROVE, N. J. *et al.* Fundamental Chemistry of Essential Oils and Volatile Organic Compounds, Methods of Analysis and Authentication. **Plants (Basel, Switzerland)** v. 11, n.6, p.789. (2022). doi:10.3390/plants11060789

SARKER, S. D., & NAHAR, L. Initial and Bulk Extraction. In: Natural Products Isolation. **Humana Press**. (2007), Second Edition.

SHAABAN M., *et al.* Bioactive compounds from *Matricaria chamomilla*: Structure identification, *in vitro* antiproliferative, antimigratory, antiangiogenic, and antiadenoviral activities. **Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences**. (2021), v. 77, p. 85–94. doi: 10.1515/znc-2021-0083.

SHABANA, S. M. *et al.* β -caryophyllene oxide induces apoptosis and inhibits proliferation of A549 lung cancer cells. **Medical oncology** (2023), v. 40, n. 7, p. 189. doi:10.1007/s12032-023-02022-9

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**. (2017), v. 22, n. 1, p. 70. doi:10.3390/molecules22010070

SHARMA, M. *et al.* Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery mechanisms, and immune system enhancement. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, (2022) v. 146, doi:10.1016/j.biopha.2021.112514

SHERRY, M., *et al.* Essential oils encapsulated in liposomes: a review. **Journal of Liposome Research**, (2013), v. 23, n. 4, p. 268–275. doc: 10.3109/08982104.2013.819888

SHINOMIYA, K. *et al.* Hypnotic activities of chamomile and passiflora extracts in sleep-disturbed rats. (2005), **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 5, p. 808-810. doi:10.1248/bpb.28.808

SRIVASTAVA, J.K.; GUPTA, S. Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. (2007), v. 55, n. 23, p. 9470-9478. doi:10.1021/jf071953k

STASHENKO, E. E., MARTINEZ, J. R. **Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications**. Chapter 3: Identification of Essential Oil Components (2017) doi:10.1002/9781119149392.ch3

UGURLUCAN, M. *et al.* (2012). Aspirin: from a historical perspective. **Recent patents on cardiovascular drug discovery**, v. 7, n. 1, p. 71–76. doi:10.2174/157489012799362377

VALDIVIESO-UGARTE, M. *et al.* Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. **Nutrients**. (2019), v. 11, n. 11, p. 2786. doi:10.3390/nu11112786

XU, M., *et al.* Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Oncology letters**, (2016). v.11, n. 5, p. 3075–3080. doi:10.3892/ol.2016.4331

YAHYA, A. *et al.* Economic Impact of Targeted and Immunotherapies in Treating Operable Esophageal and Non-Small Cell Lung Cancers, **Annals of Thoracic Surgery Short Reports**, 2025, ISSN 2772-9931, doi:10.1016/j.atssr.2025.01.008.

YAN, H.B.; XU, R.X. Effects of α -bisabolol on migration and invasion of glioblastoma cells. **Academic Journal of PLA Postgraduate Medical School**. 2018. v. 39, p. 699–706. doi: 10.3969/j.issn.2095-5227.2018.08.015

YANG, X. *et al.* Essential oil of Cinnamon exerts anti-cancer activity against head and neck squamous cell carcinoma via attenuating epidermal growth factor receptor - tyrosine kinase. **Journal of B.U.ON: official journal of the Balkan Union of Oncology**, (2015), v. 20, n. 6, p. 1518-25.

YANG, Y. H.; MAO, J. W.; TAN, X. L. Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel. **Chinese journal of natural medicines**, (2020), v. 18, n. 12, p. 890–897. doi:0.1016/S1875-5364(20)60032-2

ZENGIN, G. *et al.* A Comparative Study of Chamomile Essential Oils and Lipophilic Extracts Obtained by Conventional and Greener Extraction Techniques: Chemometric Approach to Chemical Composition and Biological Activity. **Separations**. (2023), v. 10, n. 1, p. 18. doi:10.3390/separations10010018

ZHAO, W. *et al.* The Protective Effect of *Myristica fragrans* Houtt. Extracts Against Obesity and Inflammation by Regulating Free Fatty Acids Metabolism in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Nutrients**. (2020), v.12, n. 9, p. 2507. doi:org/10.3390/nu12092507

CAPÍTULO 2

CULTURA DE CÉLULAS 3D: OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO E ANÁLISE DE ESFEROIDES TUMORAIS

1. INTRODUÇÃO

O processo convencional de descoberta de fármacos prioriza triagens de alto volume com centenas de compostos em modelos simplificados, como culturas celulares imortalizadas bidimensionais (2D). Apesar de fornecer *insights* valiosos com baixo custo e fluxos de trabalho eficientes, os ensaios *in vitro* 2D possuem baixa relevância translacional, por não replicarem o microambiente complexo dos tecidos – incluindo a arquitetura geométrica, sinalização parácrina e gradientes de nutrientes e oxigênio das células – crucial para regular proliferação, diferenciação e metabolismo (WEI *et al.*, 2021). Essa simplificação resulta em uma sensibilidade aumentada aos fármacos nos modelos 2D, o que explica por que as doses eficazes *in vitro* frequentemente falham em demonstrar eficácia *in vivo* (TOSCA *et al.*, 2023).

Modelos mais complexos e o uso de testes em animais para análises de farmacocinética, eficácia e segurança são geralmente introduzidos apenas nas fases finais do processo, uma abordagem que contribui para o baixo valor preditivo e as altas taxas de insucesso clínico (GUO *et al.*, 2024). Portanto, é necessária uma mudança de paradigma, incorporando modelos celulares preditivos e translacionais desde as etapas iniciais. Esta estratégia permite não apenas reduzir o uso de animais, em alinhamento com o princípio dos 3Rs (*replacement, reduction and refinement* = substituição, redução e refinamento), mas também fornecer dados com maior probabilidade de tradução para a clínica, resultando em medicamentos mais eficazes para os pacientes (EKERT *et al.*, 2020).

Neste contexto, as culturas de células tridimensionais (3D) representam um avanço promissor, pois mimetizam a fisiologia *in vivo* de forma mais fidedigna que os modelos convencionais. Para a pesquisa oncológica, os modelos

tumorais 3D, como os esferoides, são particularmente valiosos por sua capacidade de recapitular a complexidade do microambiente tumoral, preenchendo a lacuna entre as culturas em monocamada 2D e os modelos animais (BELFIORE *et al.*, 2021).

Nesses modelos, as células se auto-organizam em agregados que estabelecem gradientes de oxigênio e nutrientes, heterogeneidade nos estágios do ciclo celular e uma organização de receptores de membrana mais próxima da realidade *in vivo*. Tais características promovem um perfil de resistência a fármacos mais realista, tornando os esferoides uma ferramenta mais preditiva e confiável para a triagem de novas moléculas com potencial terapêutico (FONTANA *et al.*, 2021).

Contudo, um modelo experimental aprimorado, por si só, não é suficiente; a eficácia da triagem de fármacos também depende da diversidade e relevância das moléculas investigadas (BRANCATO *et al.*, 2020). Historicamente, os produtos naturais, ou metabólitos especializados, são uma das fontes mais prolíficas para o desenvolvimento de medicamentos, originando mais da metade dos fármacos utilizados atualmente (DIAS *et al.*, 2012). Apesar do vasto potencial químico, especialmente o contido na biodiversidade brasileira, muitas dessas moléculas permanecem sem atividade biológica elucidada devido a desafios técnicos na sua triagem e integração em plataformas modernas de descoberta (VALLI & BOLZANI, 2019).

Nesse sentido, o presente trabalho se propõe a unir duas frentes complementares. Primeiramente, busca-se estabelecer e otimizar um protocolo para a formação de esferoides da linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2), garantindo um modelo 3D robusto e reprodutível. Esta otimização envolverá o controle de parâmetros críticos da cultura, como: a densidade celular, as características físico-químicas do substrato (viscoelasticidade), e a cinética (tempo) de formação dos aglomerados.

Em seguida, e com base em resultados prévios promissores em modelos 2D explicitados no capítulo 1, o modelo de esferoide 3D será utilizado para aprofundar a investigação do potencial quimioterápico dos OEs de camomila

Capítulo 2

(*Matricaria chamomilla*), noz-moscada (*Myristica fragrans*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia*). O objetivo é, portanto, avaliar o potencial quimioterápico destes OEs contra a linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2), utilizando um sistema de cultura 3D para obter resultados mais preditivos e relevantes para a biologia tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo para produção de esferoides celulares e avaliar a eficácia de candidatos a quimioterápicos nesses modelos de cultura tridimensional.

2.2. Objetivos Específicos

a) Padronizar e otimizar o protocolo de formação de esferoides da linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2).

a.1) Avaliar diferentes concentrações de géis de agarose e sua influência na morfologia dos agregados celulares.

a.2) Determinar o número de células inicial ideal para a formação de esferoides com tamanho e compactação reprodutíveis.

b) Caracterizar os esferoides tumorais de HepG2 quanto à morfologia, cinética de crescimento e viabilidade celular ao longo do tempo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagem Celular e Condições de Cultivo Padrão

A linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano, HepG2 (ATCC® HB-8065™), foi utilizada em todos os ensaios. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina). As culturas foram mantidas em incubadora (MCO-18AC Panasonic, U.S. Canada) a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. As trocas de meio foram realizadas a cada 2-3 dias e as células foram repicadas ao atingirem 80% de confluência.

3.2. Caracterização Viscoelástica dos Hidrogéis de Agarose

Com o objetivo de caracterizar as propriedades físicas dos substratos utilizados para a cultura 3D, foi realizada a análise de viscoelasticidade de géis de agarose em duas concentrações (1,5% e 2%) por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) em um (Modelo Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido).

A movimentação restrita das moléculas em um gel afeta a forma como a luz é espalhada, resultando em componentes de espalhamento estáticas (relacionadas a estruturas fixas) e dinâmicas (relacionadas a flutuações internas). No caso de géis, a componente estática e dinâmica tem origem no material que espalha a luz incidente. A função de correlação temporal da intensidade da luz espalhada $g_{gel}^{(1)}(t)$, é dada por:

$$g_{gel}^{(2)}(t) = \beta |g_{gel}^{(1)}(t)|^2 + (\sigma - \beta),$$

em que, $g_{gel}^{(2)}(t)$ é a função de correlação temporal da luz espalhada que foi medida. O valor de β é obtido em uma solução aquosa com esferas-padrão de poliestireno e corresponde ao valor inicial $\beta = \lim_{t \rightarrow 0} [g_{gel}^{(2)}(t) - 1]$. Já σ é obtido a partir das medidas de espalhamento do gel, sendo:

$$\sigma = \lim_{t \rightarrow 0} [g_{gel}^{(2)}(t) - 1].$$

A partir da função de correlação $g_{gel}^{(1)}(t)$, foi possível calcular o Deslocamento Quadrático Médio (DQM) ao longo do tempo, dado por:

$$\langle r(t) \rangle^2 = -\frac{6}{q^2} \ln \left(g_{gel}^{(1)}(t) \right),$$

onde, q é o vetor de espalhamento.

3.3. Otimização do Protocolo para Formação de Esferoides 3D

Para estabelecer um protocolo robusto e reprodutível, foram testadas diferentes condições, variando-se a concentração do hidrogel, a densidade celular inicial e o tempo de cultivo (Otimização do protocolo de Ferraro *et al.*, 2024).

3.3.1. Preparo das Placas com Hidrogel de Agarose

- a) Soluções de agarose a 1,5% e 2% (m/v) foram preparadas em meio RPMI-1640.
- b) Após aquecimento em micro-ondas para completa dissolução, 50 μ L da solução de agarose correspondente foram aplicados em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços de fundo chato.
- c) A placa foi exposta à luz UV em uma Cabine de Segurança Biológica Classe II, modelo SBIIA1-960/4 (Filterflux, São Paulo, SP), durante 30 minutos para solidificação e esterilização do gel.

3.3.2. Semeadura das células HepG2

- a) As células HepG2 em fase de crescimento exponencial foram tripsinizadas, contadas em câmara de *Neubauer* e sua viabilidade foi verificada com corante Azul de Tripan.

b) Duas suspensões celulares foram preparadas em meio RPMI suplementado com 4% de SFB, nas densidades de 5×10^3 e 1×10^4 células por 100 μL .

c) Um volume de 100 μL de cada suspensão celular foi cuidadosamente adicionado sobre a base de hidrogel de agarose em seus respectivos poços.

3.3.3. Cinética de Formação de Esferoides

a) As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 .

b) A formação, compactação e morfologia dos agregados celulares foram monitoradas nos dias 3 e 5 pós-semeadura, utilizando um microscópio invertido modelo Eclipse T5100 (Nikon, Tóquio, Japão). O equipamento estava equipado com um conjunto de objetivas Plan Fluor (10x/0.30 NA e 20x/0.45 NA). As imagens foram capturadas por uma câmera JAI CM-140GE (v. 2.0.4), acoplada ao microscópio, e operada pelo software JAI Control Tool (JAI A/S, Copenhague, Dinamarca).

c) A troca de 50% do meio de cultura (50 μL) foi realizada a cada 3 dias.

3.3.4. Avaliação da Citotoxicidade dos OEs em Modelo 3D

Após a padronização do protocolo, os esferoides foram utilizados para o ensaio de citotoxicidade.

a) Os OEs de camomila (*Matricaria chamomilla*), noz-moscada (*Myristica fragrans*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia*) foram diluídos em DMSO para obtenção de soluções-estoque. Estes foram então diluídos em meio de cultura para atingir as concentrações de IC_{10} , IC_{50} e IC_{90} previamente determinadas, garantindo que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 0,05% (v/v).

b) Os esferoides foram tratados com os óleos e incubados por 24, 48h e 120h em estufa (37°C , 5% CO_2).

c) Após os períodos de tratamento, os parâmetros morfológicos dos esferoides foram avaliados por fotomicroscopia de luz, e as medidas foram realizadas com o *software* ImageJ (v1.54g, NIH, EUA).

3.4. Análise Estatística

Os parâmetros morfológicos dos esferoides (diâmetro, circularidade e solidez) foram quantificados a partir de fotomicrografias utilizando o *software* ImageJ. Para avaliar o efeito relativo dos tratamentos ao longo do tempo, os dados de diâmetro foram normalizados.

Para cada grupo experimental (Controle, IC₁₀, IC₅₀ e IC₉₀), foi primeiramente calculada a média das medidas de diâmetro no tempo zero (T=0). Este valor médio foi estabelecido como a linha de base de 100% para o respectivo grupo. Subsequentemente, cada medida individual de diâmetro nos tempos de 24h, 48h e 120h foi dividida pela média de referência do seu grupo no tempo zero e multiplicada por 100 para ser expressa como uma porcentagem.

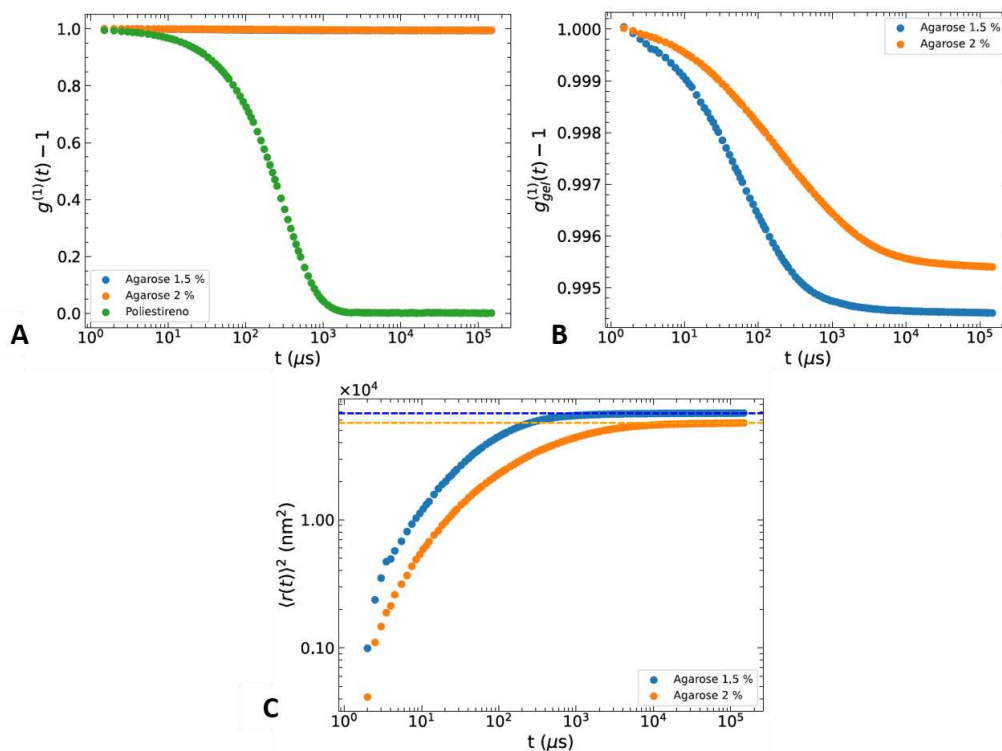
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism v.8.0.2. As diferenças entre os grupos ao longo do tempo foram avaliadas por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Dunnett para comparações múltiplas contra o grupo controle. As diferenças foram consideradas significativas quando o p-valor foi inferior a 0.05 ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização Viscoelástica dos Hidrogéis de Agarose como Substrato para Cultura 3D

Para caracterizar as propriedades mecânicas dos substratos, géis de agarose a 1,5% e 2% foram analisados por Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS) (FIGURA 28). Foram realizadas várias medidas da função de correlação temporal da intensidade da luz espalhada em uma solução aquosa com esfera-padrão de poliestireno e os géis de agarose na concentração de 1,5% e 2%, com o objetivo de medir a diferença de viscoelasticidade entre os géis.

Figura 28. Análise de viscoelasticidade dos hidrogéis de agarose por DLS



(A) Função de correlação temporal da intensidade da luz espalhada $g_{gel}^{(1)}(t)$ para a solução padrão de poliestireno e para os géis de agarose a 1,5% e 2%. (B) Detalhe da função de correlação apenas para os géis de agarose. (C) Deslocamento Quadrático Médio $\langle r(t) \rangle^2$ em função do tempo para os géis a 1,5% e 2%. As linhas pontilhadas indicam o valor assintótico de cada curva.

Como é possível observar nas Figuras 1A e 1B, a função de correlação temporal decai mais lentamente para os géis (Aga-1.5% curva azul e Aga-2% curva laranja) em comparação com a solução de poliestireno (curva verde), indicando a movimentação restrita das moléculas na rede do gel. A partir desses dados, o Deslocamento Quadrático Médio (MSD) foi calculado (Figura 1C). O MSD representa a mobilidade das partículas na rede do gel, e é inversamente proporcional à rigidez do gel; um menor deslocamento indica uma rede mais restritiva e, portanto, um gel mais rígido.

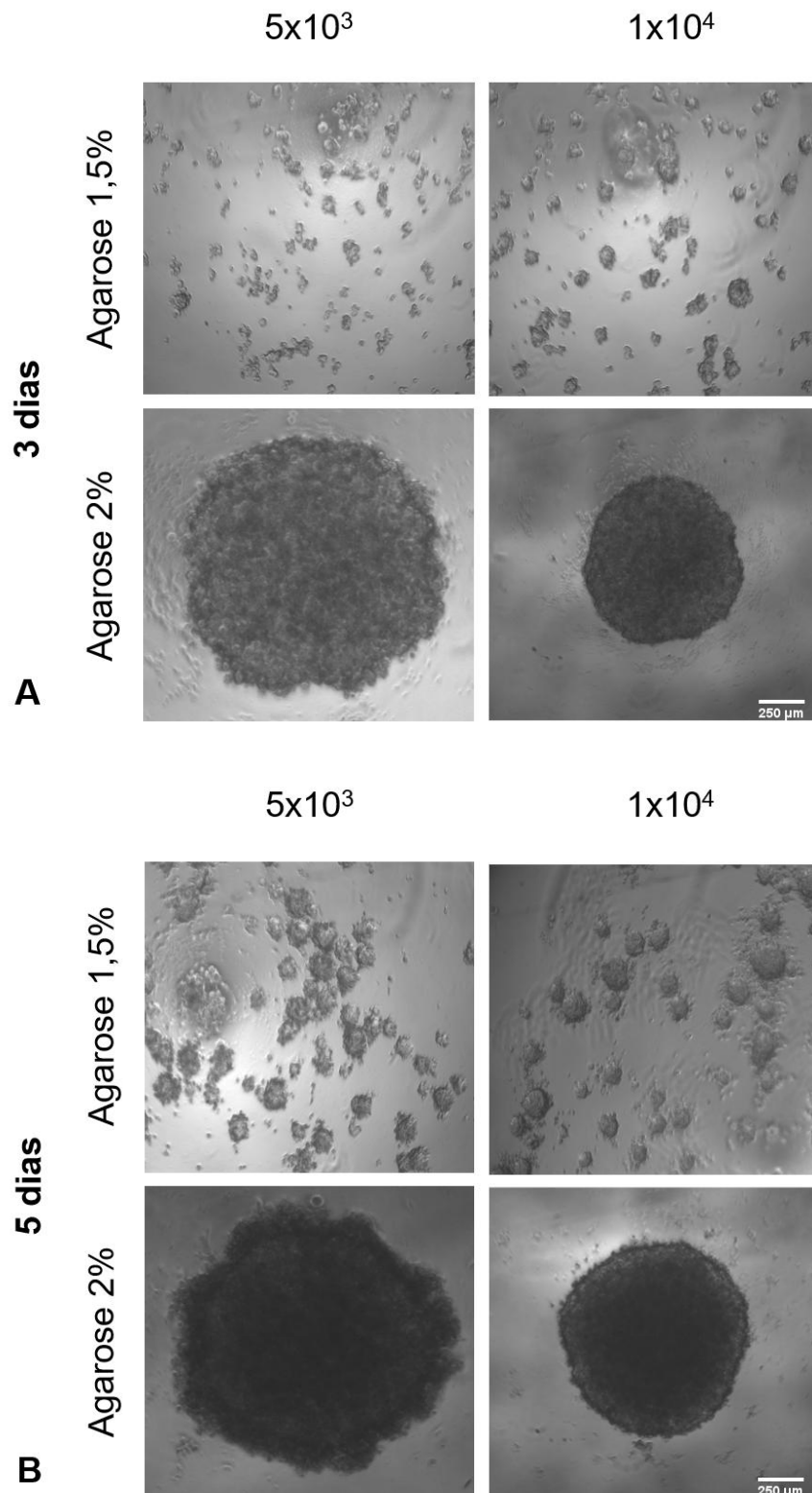
Observou-se que o gel de agarose a 2% apresentou um MSD menor, tendendo a um valor assintótico de 238 nm², enquanto o gel a 1,5% tendeu a 261 nm². resultando em uma diferença de 23 nm. Este menor deslocamento indica uma rede polimérica mais restritiva e, conseqüentemente, uma rigidez maior para o gel de agarose a 2% em comparação ao de 1,5%.

4.2. Padronização do Protocolo de Formação de Esferoides de HepG2

Após a otimização da plataforma física de cultivo, o foco foi direcionado à padronização do modelo biológico para garantir a formação de esferoides de HepG2 com morfologia consistente e reprodutível. Esta etapa concentrou-se na análise de imagens de microscopia para avaliar o impacto de diferentes densidades celulares e concentrações do substrato de agarose na cinética de formação e na arquitetura final dos agregados.

A Figura 29 apresenta uma análise comparativa dos resultados obtidos. As imagens de microscopia de contraste de fase ilustram a morfologia dos agregados celulares sob as diferentes condições testadas nos dias 3 e 5 de cultivo.

Figura 29 – Otimização da formação de esferoides de HepG2



A figura mostra imagens comparativas de microscopia de contraste de fase de agregados celulares formados após (A) 3 dias e (B) 5 dias de cultivo. Foram avaliadas duas densidades celulares (5.000 e 10.000 células/poço) e duas concentrações de substrato de agarose (1,5% e 2%). Barra de escala = 250 μ m. Objetiva de 4x.

A densidade celular inicial e a rigidez do substrato tiveram um impacto direto no tamanho final dos agregados. Como observado, 10.000 células/poço cultivadas sobre o gel de agarose a 2% (maior rigidez), resultaram em um esferoide compacto, esférico e com bordas mais bem definidas, em comparação com 5.000 células/poço cultivadas sobre agarose a 1,5%, que formaram múltiplos agregados irregulares e dispersos.

A análise temporal revelou que em 3 dias já havia formação de agregados em sua máxima compactação e estabilidade morfológica. Em 5 dias de cultivo já é possível observar a presença de núcleo necrótico, devido à limitação da difusão de oxigênio e nutrientes. Portanto, com base na análise qualitativa da morfologia, a condição padronizada para os ensaios subsequentes foi definida como 10.000 células/poço, cultivadas sobre substrato de agarose a 2% por 3 dias.

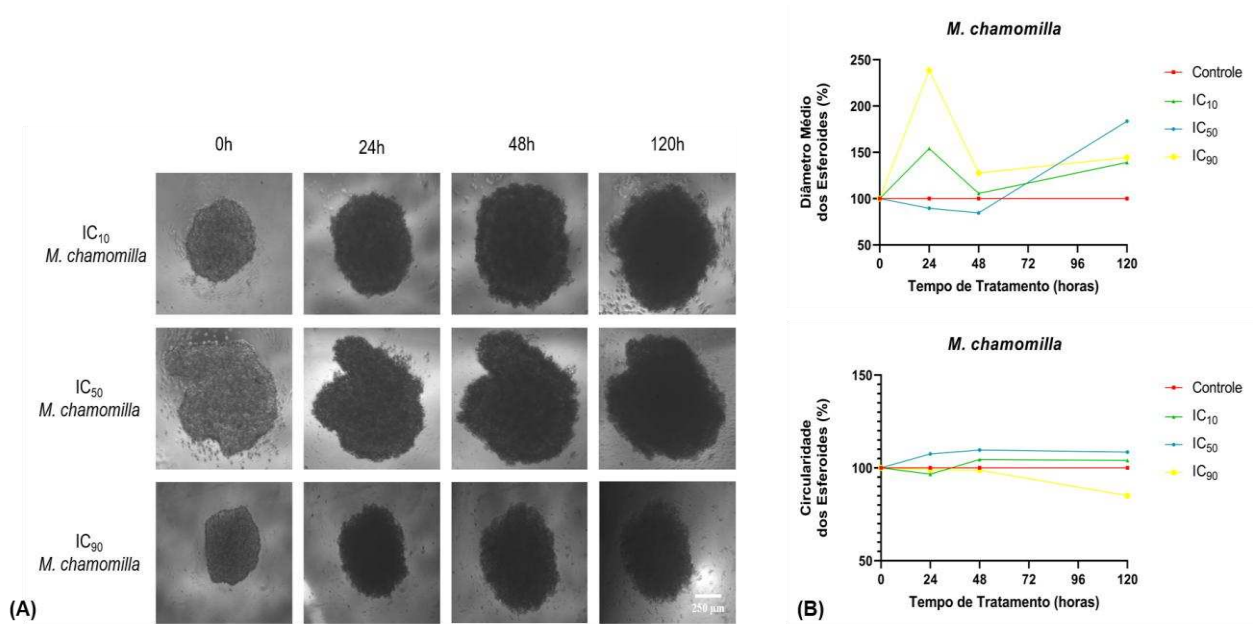
4.3. Análise da Citotoxicidade dos OEs no Modelo de Esferoides 3D

Com o modelo de esferoides de HepG2 padronizado, investigou-se o potencial citotóxico dos OEs de camomila (*Matricaria chamomilla*), noz-moscada (*Myristica fragrans*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia*).

4.3.1. Efeito dos OEs na Morfologia e Integridade dos Esferoides

Inicialmente, o impacto dos tratamentos sobre a estrutura tridimensional dos esferoides foi avaliado por fotomicroscopia de luz ao longo de 120 horas (FIGURAS 30, 31, 32 e 33). Os esferoides do grupo controle, tratados apenas com o veículo (DMSO 0,05%), mantiveram sua morfologia compacta, esférica e com bordas bem definidas durante todo o período experimental, confirmando a estabilidade do modelo. Em contrapartida, os esferoides tratados com os OEs apresentaram alterações morfológicas significativas: progressiva perda da integridade estrutural, caracterizada pela desagregação celular na periferia, perda da esfericidade (circularidade < 0,9) e uma notável alteração no diâmetro médio.

Figura 30 – Efeito do óleo de *M. chamomilla* na morfologia dos esferoides de HepG2



(A) Imagens representativas de microscopia de luz dos esferoides tratados com as concentrações de IC₁₀, IC₅₀ e IC₉₀ do OE de *M. chamomilla* por 0, 24, 48 e 120 horas. Barra de escala = 250 μ m. (B) Gráfico superior representa a variação percentual do diâmetro médio e o gráfico inferior representa a circularidade dos esferoides ao longo de 120 horas de tratamento com o OE. Os valores foram normalizados pela média de cada grupo no tempo zero, considerado como 100%. Os pontos representam a média \pm o erro padrão da média (EPM) de [N=3] replicatas por grupo. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle em cada tempo (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

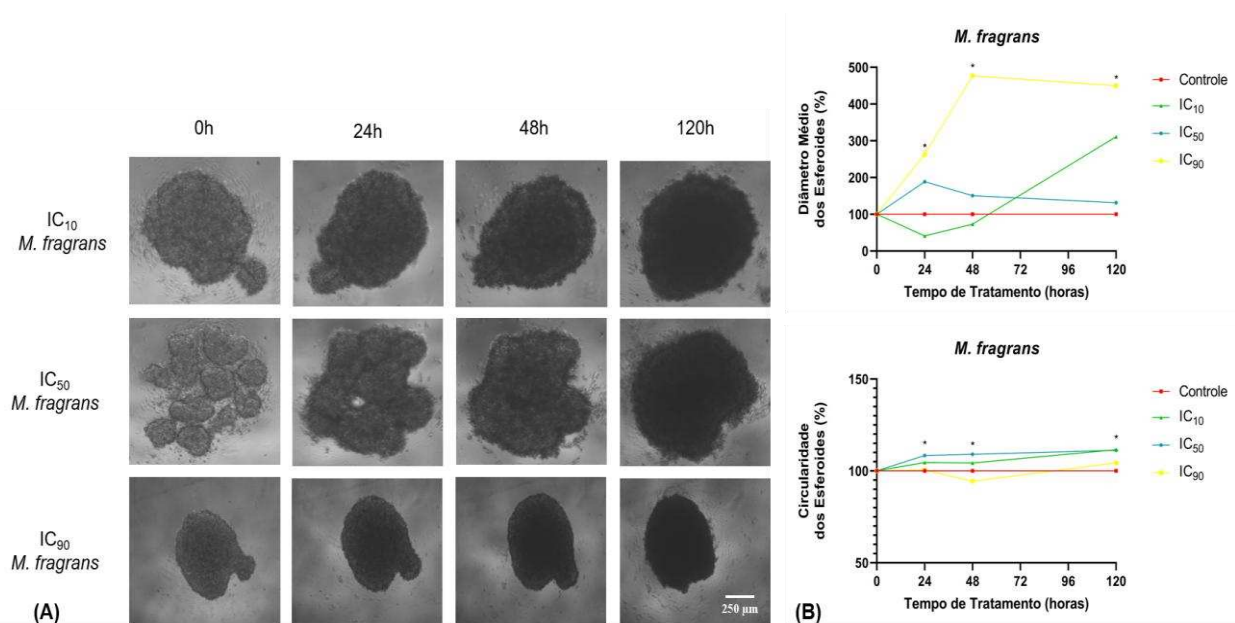
As observações qualitativas (Figura 30-A) revelaram uma clara alteração morfológica dose e tempo-dependente nos esferoides tratados com o OE de *M. chamomilla*. Enquanto os esferoides do grupo controle (Figura 29) mantiveram uma estrutura compacta e esférica durante todo o período, os esferoides tratados exibiram uma progressiva perda de integridade.

A quantificação do diâmetro médio dos esferoides normalizado pelo valor inicial de cada grupo (Figura 30-B, gráfico superior), confirmou estas observações. Nos grupos tratados, houve grande variação do diâmetro médio, provavelmente devido ao desprendimento e espalhamento de células na periferia do esferoide.

A perda de integridade estrutural foi quantificada pela análise de circularidade (Figura 30-B, gráfico inferior). Os esferoides do grupo controle mantiveram uma

alta circularidade (valor próximo a 0,9) durante todo o experimento, indicando uma morfologia estável e esférica. Em contrapartida, os tratamentos com *M. chamomilla* induziram uma perda de circularidade progressiva e dose-dependente. O tratamento com IC₉₀ durante 120 horas apresentou a queda mais acentuada, atingindo um valor de circularidade inferior a 0.75, o que denota uma desorganização do agregado tridimensional. A redução da circularidade não foi estatisticamente significativa para nenhum dos grupos em comparação ao controle.

Figura 31 – Efeito do óleo de *M. fragrans* na morfologia dos esferoides de HepG2

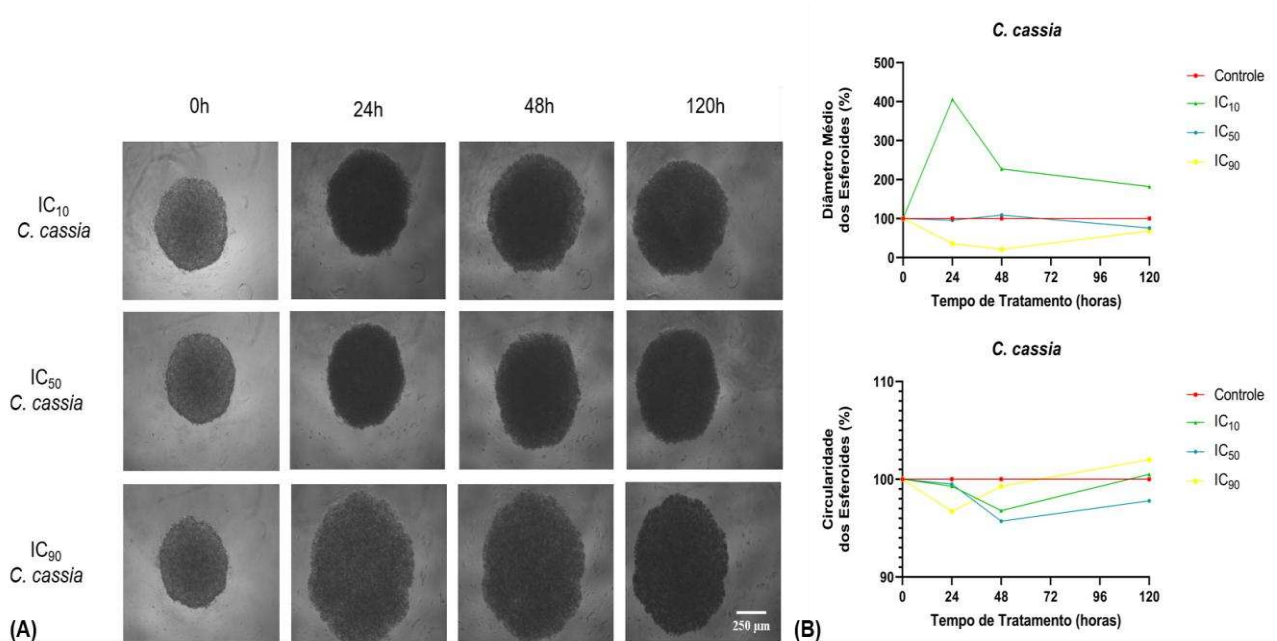


(A) Imagens representativas de microscopia de luz dos esferoides tratados com as concentrações de IC₁₀, IC₅₀ e IC₉₀ do OE de *M. fragrans* por 0, 24, 48 e 120 horas. Barra de escala = 250 μm. (B) Gráfico superior representa a variação percentual do diâmetro médio e o gráfico inferior representa a circularidade dos esferoides ao longo de 120 horas de tratamento com o OE. Os valores foram normalizados pela média de cada grupo no tempo zero, considerado como 100%. Os pontos representam a média ± o erro padrão da média (EPM) de [N=3] replicatas por grupo. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle em cada tempo (* p < 0.05; ** p < 0.01).

Na figura 31-A é possível observar que o tratamento com diferentes concentrações de *M. fragrans* por 120 horas não impediu com que as células HepG2 continuassem a se aglomerar. Isso é confirmado pelo aumento da quantificação do diâmetro médio (Figura 31-B, gráfico superior), e da circularidade (Figura 31-B, gráfico inferior). O diâmetro médio aumentou

significativamente no grupo tratado com IC₉₀ em relação ao controle (* p < 0.05). Em relação à circularidade, o grupo tratado com a IC₅₀ apresentou aumento estatisticamente significativo (* p < 0.05) em comparação ao controle.

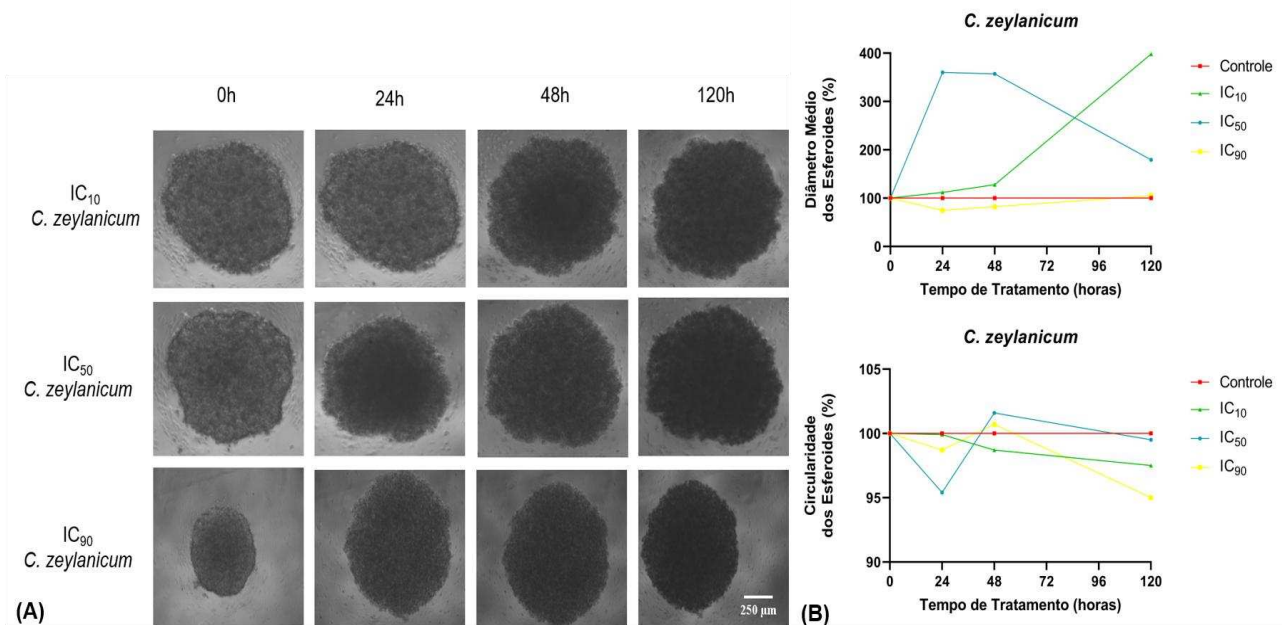
Figura 32 – Efeito do óleo de *C. cassia* na morfologia dos esferoides de HepG2



(A) Imagens representativas de microscopia de luz dos esferoides tratados com as concentrações de IC₁₀, IC₅₀ e IC₉₀ do OE de *C. cassia* por 0, 24, 48 e 120 horas. Barra de escala = 250 μm. (B) Gráfico superior representa a variação percentual do diâmetro médio e o gráfico inferior representa a circularidade dos esferoides ao longo de 120 horas de tratamento com o OE. Os valores foram normalizados pela média de cada grupo no tempo zero, considerado como 100%. Os pontos representam a média ± o erro padrão da média (EPM) de [N=3] replicatas por grupo. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle em cada tempo (* p < 0.05; ** p < 0.01).

A figura 32-A demonstra as alterações morfológicas nos esferoides tratados com *C. cassia*. A quantificação do diâmetro médio dos esferoides (Figura 32-B, gráfico superior), aponta aumento do tamanho do esferoide tratados com a IC₁₀ nas primeiras 24h e redução de tamanho nos grupos tratados com a IC₅₀ e IC₉₀. A análise de circularidade (Figura 32-B, gráfico inferior) revelou uma redução da esfericidade em todos os grupos tratados. Não houve diferença significativa em nenhum dos grupos.

Figura 33 – Efeito do óleo de *C. zeylanicum* na morfologia dos esferoides de HepG2



(A) Imagens representativas de microscopia de luz dos esferoides tratados com as concentrações de IC₁₀, IC₅₀ e IC₉₀ do OE de *C. zeylanicum* por 0, 24, 48 e 120 horas. Barra de escala = 250 μm. (B) Gráfico superior representa a variação percentual do diâmetro médio e o gráfico inferior representa a circularidade dos esferoides ao longo de 120 horas de tratamento com o OE. Os valores foram normalizados pela média de cada grupo no tempo zero, considerado como 100%. Os pontos representam a média ± o erro padrão da média (EPM) de [N=3] replicatas por grupo. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle em cada tempo (* p < 0.05; ** p < 0.01).

Por fim, a figura 33-A demonstra as alterações morfológicas dos esferoides tratados com as concentrações de IC₁₀, IC₅₀ e IC₉₀ do OE *C. zeylanicum*. A quantificação do resultado é mostrada na figura 33-B onde o grupo tratado com a IC₁₀ após 48h mostrou aumento do diâmetro e redução da circularidade; o grupo tratado com a IC₅₀ apresentou o mesmo comportamento com apenas 24h; e no grupo tratado com a IC₉₀ houve diminuição do diâmetro e da circularidade nas primeiras 24 horas, com queda acentuada ao final do tratamento (circularidade = 0,83).

As profundas alterações morfológicas observadas, especialmente a perda de compactação, são fortes indicativos de citotoxicidade e morte celular.

5. DISCUSSÃO

A caracterização das propriedades mecânicas de substratos para cultura celular é uma etapa fundamental e indispensável para o desenvolvimento de modelos *in vitro* que mimetizem o microambiente tecidual de forma fidedigna. A investigação sobre as propriedades viscoelásticas dos hidrogéis de agarose é particularmente relevante. Nossos resultados demonstraram que o gel de agarose a 2% é mais rígido que o de 1,5%, apresentando um menor Deslocamento Quadrático Médio (MSD) de 238 nm² contra 261 nm².

Enquanto nosso estudo empregou uma abordagem indireta através do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para inferir a rigidez do substrato, o trabalho de Abidine e colaboradores (2021) utilizou uma técnica de contato direto – a microrreologia baseada em Microscopia de Força Atômica (AFM) –, para quantificar as propriedades viscoelásticas (módulos elástico G' e de perda G'') de células e esferoides. Apesar das diferenças metodológicas, as conclusões são convergentes e complementares. Nossa observação de que um Deslocamento Quadrático Médio (MSD) menor no gel a 2% indica uma rede polimérica mais restritiva e, portanto, mais rígida, é uma premissa fundamental que sustenta os experimentos no artigo referido. Abidine *et al.* (2021) modularam a rigidez de seus substratos de poliacrilamida (variando de 5 a 28 kPa) alterando a concentração do agente reticulador, um princípio análogo ao nosso de aumentar a concentração de agarose para obter um substrato mais rígido.

O ponto central de convergência entre os trabalhos é o conceito de mecanossensibilidade celular. Abidine *et al.* (2021) demonstram que as células tumorais não são entidades passivas; elas "sentem" e respondem ativamente à rigidez do substrato, alterando suas próprias propriedades mecânicas e comportamentais. Especificamente, foi revelado que as linhagens celulares de câncer de bexiga epitelial com alta malignidade e invasividade (T24 e J82), tornam-se mecanicamente mais rígidas quando cultivadas em substratos mais duros, sugerindo um mecanismo adaptativo.

Nesse contexto, a caracterização e a subsequente escolha do substrato de agarose a 2% em nosso trabalho, além de otimizar a técnica, representa a criação de um microambiente mecânico específico. O sucesso na formação de

esferoides mais compactos, esféricos e com bordas bem definidas sobre o substrato mais rígido (observado na Figura 29 de nossos resultados) é a consequência biológica direta dessa escolha, validando a aplicação prática dos princípios investigados por Abidine *et al.* (2021). A maior rigidez do substrato forneceu os estímulos físicos necessários para guiar a auto-organização celular, resultando em um modelo 3D mais consistente e reproduzível.

Após definir as propriedades físicas e mecânicas do substrato, nosso foco foi determinar a densidade celular e o tempo de crescimento ótimo dos esferoides, para padronização do protocolo, de forma a garantir a reprodutibilidade dos ensaios. A escolha deste substrato mais rígido, combinada com uma densidade celular inicial de 10.000 células/poço, foi determinante para a formação de esferoides únicos, compactos e esféricos em apenas 3 dias. Este achado está em conformidade com estudos que demonstram que as propriedades mecânicas do substrato, como a rigidez, influenciam diretamente a mecanotransdução, a adesão célula-célula e, conseqüentemente, a morfogênese e compactação dos agregados celulares (PUTRA *et al.*, 2023). Uma maior rigidez do substrato pode favorecer a formação de junções celulares mais fortes, essenciais para a integridade do esferoide.

A aplicação do modelo 3D otimizado para avaliar o potencial quimioterápico de produtos naturais, especificamente OEs, alinha-se à busca por novas moléculas bioativas, um campo onde a biodiversidade se mostra uma fonte prolífica.

A principal observação de nossos ensaios de citotoxicidade foi a progressiva perda da integridade estrutural dos esferoides tratados com OEs. A desagregação celular na periferia, a perda de esfericidade e a alteração no diâmetro são fortes indicativos de um mecanismo de ação que interfere na adesão célula-célula, um pilar para a manutenção da arquitetura tecidual (ZHU *et al.*, 2025).

A morfogênese de um esferoide é um processo de auto-organização celular que depende criticamente da superexpressão de proteínas de adesão da MEC, principalmente, de caderinas. A formação começa com células individuais que se unem em um agregado instável via ligações de integrina-MEC. Este é então

consolidado em uma massa celular compacta através do aumento da expressão de caderinas e do estabelecimento de fortes ligações homofílicas. Com a maturação e o aumento de volume, especialmente para diâmetros acima de 500 µm, a estrutura do esferoide passa a limitar o transporte molecular. Essa restrição difusional gera uma organização em três zonas distintas: uma periferia de células proliferativas, uma camada intermediária de células viáveis, mas quiescentes, e um centro necrótico formado devido à privação de nutrientes e ao acúmulo de catabólitos (LIN & CHANG, 2008).

A E-caderina é uma das moléculas de adesão mais importantes para formação e manutenção de esferoides em células epiteliais, como as células HepG2. O trabalho de Stadler *et al.* (2018) demonstrou que subpopulações de células de câncer de cólon que não conseguem se integrar aos esferoides (fenótipo NSF) apresentam perda de moléculas de adesão essenciais, como E-caderina, P-caderina ou a-catenina. Fazendo uma analogia a esse estudo, a desintegração morfológica que observamos nos esferoides tratados com os OEs pode ser interpretada como uma “fenocópia farmacologicamente induzida do fenótipo NSF”. Ou seja, os compostos ativos nos OEs parecem anular a função das proteínas de adesão, levando as células a se dissociarem do agregado de maneira análoga à perda genética/epigenética dessas moléculas.

De fato, a literatura corrobora fortemente que os principais constituintes dos óleos aqui estudados modulam vias de sinalização que regulam diretamente a adesão celular e a Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT). Por exemplo, o cinamaldeído, componente majoritário dos óleos de canela, demonstrou suprimir a progressão do câncer de ovário ao inibir a via PI3K/AKT induzida por EGF. Em seu estudo, Wang *et al.* (2022) mostraram que o cinamaldeído reverteu o processo de EMT, aumentando a expressão da E-caderina e diminuindo marcadores mesenquimais como a N-caderina e Vimentina, um efeito mediado pela inibição da fosforilação de PI3K e AKT.

De forma semelhante, o estudo de Bao & Muge (2021) com a miristicina, principal constituinte do óleo de noz-moscada, revelou que este composto inibe a migração e invasão de células de carcinoma hepático, ao suprimir a EMT. O mecanismo elucidado foi justamente a inibição da via de sinalização

PI3K/Akt/mTOR, resultando no aumento da E-caderina e na diminuição da N-caderina. Nossos resultados, nos quais os óleos de canela e noz-moscada causaram a desagregação dos esferoides, estão em perfeita consonância com esses achados mecanísticos. A perda de adesão que observamos visualmente pode ser, portanto, a consequência morfológica da inibição da via PI3K/Akt/mTOR e da subsequente desregulação das caderinas, conforme descrito por esses autores.

Até mesmo para o óleo de camomila, cujo perfil químico é dominado por sesquiterpenos como o α -Bisabolol e seus óxidos, a conexão com esta via central é evidente. Um estudo recente de Arjunan *et al.* (2024) demonstrou que o α -bisabolol induz apoptose em células de câncer de mama (MCF-7) através da supressão da via de sinalização NF- κ B/PI3K/Akt. Embora o estudo não tenha focado na EMT, ele estabelece que o α -Bisabolol também atua sobre a via PI3K/Akt para exercer seu efeito antitumoral.

Portanto, nossa hipótese de que os compostos bioativos dos OEs atuam desestabilizando as junções célula-célula é fortemente embasada. Então, quando observamos os resultados nos gráficos onde os tratamentos causaram um aumento no diâmetro médio, mesmo que o número de células vivas não tenha aumentado (ou até tenha diminuído um pouco), a explicação pode estar justamente na perda de adesão entre as células, fazendo com que o esferoide se torne frouxo e desorganizado, passando a ocupar mais espaço.

Nossos resultados com o OE de *M. chamomilla* exemplificam uma resposta citotóxica clássica: as imagens microscópicas (Figura 30-A) e a análise quantitativa (Figura 30-B) mostram uma clara perda de integridade estrutural, com células se desprendendo da periferia. Essa desagregação é refletida diretamente pela diminuição progressiva da circularidade, especialmente na concentração de IC₉₀. A perda da forma esférica indica uma falha nas forças de adesão intercelular que mantêm a estrutura compacta do esferoide. Portanto, a redução da circularidade pode ser interpretada não apenas como um dano visível, mas como um indicador quantitativo da perda de uma característica fisiologicamente crucial, validando sua eficácia como um agente que desestabiliza a arquitetura do tumor.

Da mesma forma, as flutuações no diâmetro médio, refletem essa perda de compactação. Em vez de um encolhimento uniforme, o desprendimento e o espalhamento de células na periferia podem aumentar a área total projetada do aglomerado, levando a picos no diâmetro medido antes que a morte celular e a lise reduzam o tamanho geral.

No entanto, nem todos os tratamentos resultaram em uma simples desintegração. O tratamento com o óleo de *M. fragrans* (Figura 31), por exemplo, levou a um aumento significativo e sustentado do diâmetro médio, especialmente na concentração IC₉₀, sugerindo que o mecanismo de ação pode não ser imediatamente citotóxico, mas que interfere no processo de compactação. As células continuam a se aglomerar, ou talvez até proliferar de forma desorganizada, mas falham em estabelecer as adesões firmes necessárias para formar uma única esfera densa, resultando em uma massa celular maior e mais frouxa. Essa falha em atingir a compactação, segundo Leung e colaboradores (2015), compromete a formação de gradientes fisiológicos, indicando um tipo diferente de perturbação no modelo tumoral.

Os óleos de canela (Figuras 32 e 33), apresentaram respostas intermediárias, com picos transitórios de diâmetro e reduções mais modestas na circularidade. Isso pode indicar uma combinação de efeitos: uma desestabilização inicial das adesões periféricas (aumentando o diâmetro) seguida por uma ação citostática ou citotóxica que limita o crescimento ou induz a morte celular (reduzindo o diâmetro). Em conjunto, o agregado celular sofre afrouxamento gerando uma baixa circularidade (formato elipsoidal), apresentando gradientes de difusão mais rasos.

6. CONCLUSÃO

Neste capítulo, o protocolo de formação de esferoides da linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2) foi padronizado e otimizado com sucesso. A caracterização das propriedades mecânicas do substrato foi um passo fundamental, onde se demonstrou que a agarose a 2% possui maior rigidez. A combinação deste substrato com uma densidade celular inicial de 1×10^4 células/poço foi estabelecida como a condição ideal, resultando na formação de esferoides únicos, compactos e morfologicamente reprodutíveis, cumprindo assim os objetivos de padronização do estudo.

A aplicação deste modelo 3D na avaliação de OEs revelou um mecanismo de ação antitumoral relevante. O principal efeito observado não foi a citotoxicidade direta, mas sim a desestabilização da arquitetura do esferoide, manifestada pela perda de integridade, desagregação celular e alterações morfológicas. Estes achados indicam que o alvo primário dos compostos bioativos pode ser a adesão célula-célula, um mecanismo complexo que não poderia ser elucidado em modelos de cultura bidimensionais.

Os resultados obtidos com os OEs fornecem uma base sólida para investigações futuras. Como próximo passo, a análise de viabilidade celular por microscopia confocal, utilizando o ensaio Cyto3D® Live/Dead, é uma etapa crucial para confirmar visualmente que as alterações morfológicas observadas são, de fato, resultado da morte celular. Investigações subsequentes, incluindo o isolamento desses compostos e a validação destes achados em modelos pré-clínicos mais complexos, poderão reforçar a importância de plataformas 3D para a oncologia translacional.

7. REFERÊNCIAS

ABIDINE, Y. *et al.* Viscoelastic Properties in Cancer: From Cells to Spheroids. **Cells**. (2021). v. 10, n. 7, p. 1704. doi:10.3390/cells10071704

ARJUNAN, S.; BALARAMAN, D.; ALQURAIISHI, M. I. WITHDRAWN: Modulatory effect of α -Bisabolol on induced apoptosis via mitochondrial and NF- κ B/Akt/PI3K Signaling pathways in MCF-7 breast cancer cells, **Research Square**, (2024), doi:10.21203/rs.3.rs-3878405/v2

BAO, H., & MUGE, Q. Anticancer effect of myristicin on hepatic carcinoma and related molecular mechanism. **Pharmaceutical biology**, (2021), v. 59, n. 1, p. 1126–1132. doi:10.1080/13880209.2021.1961825

BELFIORE, L. *et al.* Generation and analysis of 3D cell culture models for drug discovery, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, (2021), v. 163, 105876, doi:10.1016/j.ejps.2021.105876.

BRANCATO, V. *et al.* Could 3D models of cancer enhance drug screening? **Biomaterials**, (2020). v. 232, p. 119744. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119744

DIAS, D. A.; URBAN, S. & ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, (2012). v.2, n. 2, p. 303–336. doi:10.3390/metabo2020303

EKERT, J. E. *et al.* Recommended Guidelines for Developing, Qualifying, and Implementing Complex *In Vitro* Models (CIVMs) for Drug Discovery. **SLAS Discovery**, (2020), v. 25, n. 10, p. 1174-1190. doi:10.1177/2472555220923332

FERRARO, R.; CASERTA, S.; GUIDO, S. A Low-Cost, User-Friendly Rheo-Optical Compression Assay to Measure Mechanical Properties of Cell Spheroids in Standard Cell Culture Plates. **Advanced Materials Technologies**, (2024), v. 9, n. 2301890. doi:10.1002/admt.202301890

FONTANA, F. *et al.* *In Vitro* 3D Cultures to Model the Tumor Microenvironment. **Cancers**, (2021), v. 13, n. 12, p. 2970. doi:10.3390/cancers13122970

GUO, H. *et al.* The Pivotal Role of Preclinical Animal Models in Anti-Cancer Drug Discovery and Personalized Cancer Therapy Strategies. **Pharmaceuticals** (2024), v. 17, n. 8, p. 1048. Doi:10.3390/ph17081048

LEUNG, B. M. *et al.* Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. **Biomaterials Science**. (2015), v. 3, n. 2, p. 336-344. doi: 10.1039/c4bm00319e

LIN, R.-Z. & CHANG, H.-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnology Journal**, (2008), v. 3, p. 1172-1184. doi:10.1002/biot.200700228

PUTRA, V.D.L.; KILIAN, K.A. & KNOTHE TATE, M.L. Biomechanical, biophysical and biochemical modulators of cytoskeletal remodelling and emergent stem cell lineage commitment. **Communications Biology**, (2023). v. 6, n. 75, doi:10.1038/s42003-022-04320-w

STADLER, M. *et al.* Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. **Scientific Reports**, (2018), v.8, n. 1151, doi:10.1038/s41598-018-19384-0

TOSCA, E. M. *et al.* Replacement, Reduction, and Refinement of Animal Experiments in Anticancer Drug Development: The Contribution of 3D In Vitro Cancer Models in the Drug Efficacy Assessment. **Biomedicines**, (2023). v. 11, n. 4, p. 1058. doi:10.3390/biomedicines11041058

WANG, Y. *et al.* Cinnamaldehyde Suppressed EGF-Induced EMT Process and Inhibits Ovarian Cancer Progression Through PI3K/AKT Pathway. **Frontiers in pharmacology**, (2022), v. 13, p. 779608. doi:10.3389/fphar.2022.779608

WEI, F.; WANG, S.; GOU, X. A review for cell-based screening methods in drug discovery. **Biophysics reports**, (2021), v. 7, n. 6, p. 504–516. doi:10.52601/bpr.2021.210042

ZHU, S. *et al.* Influence of experimental variables on spheroid attributes. **Scientific Reports**. (2025), v. 15, n. 9751, doi:10.1038/s41598-025-92037-1

CHAPTER 3

VASCULARIZED TUMOR EXPLANTS

1. INTRODUCTION

A solid tumor is composed of cancer cells and host stromal cells - nourished by blood vessels and drained by lymphatic vessels - and all these components are incorporated into an extracellular matrix (JAIN *et al.*, 2013). The interaction between these cells and the MEC influences the expression of several genes that control the pathophysiological characteristics of the tumor and affect the response to various therapies (SHIMPI & FISCHBACH, 2021). Blood, lymphatic vasculature, fibroblasts, immune cells and the extracellular matrix associated with tumors are abnormal, and collaborate with each other to create a hostile environment, characterized by hypoxia, low pH and high pressure of the interstitial fluid (MARTIN *et al.*, 2019).

Over the years, many approaches have been developed to deconstruct tumors or synthesize them in culture for the purpose of analyzing the biology of cancer and identifying promising drugs (BAZOU *et al.*, 2016). The development of human-based mimetic tissue constructions for disease modeling and drug testing are also known as "organs on a chip" (CHO *et al.*, 2023). Clinical oncologists need these tools to improve the reliability of medicines and the implementation of personalized medicine.

3D cancer cell lines, such as spheroids, are valuable tools that can more truthfully predict the heterogeneity of the tumor than the 2D cell monolayer. But spheroids still lack important interactions between the different components of the tumor, such as immune cells and vasculature. In this sense, an alternative arises to determine the effectiveness of antitumor therapies in models more similar to the tumor microenvironment: vascularized tumor explants (VTE) (BAZOU *et al.*, 2016).

Blood vessels consist of the same basic structure: a concentric inner layer of endothelial cells (EC), surrounded by an average layer of smooth muscle cells, and a final layer, or adventitia, formed by extracellular matrix (ECM), fibroblasts and nerve cells. Communication between EC and smooth muscle cells (SMCs) occurs at the beginning of embryogenesis, when the vessels begin to form, and remains until the maturation of the vasculature (LILLY, 2014).

The creation of *in vitro* vascularized tissues occurs through the co-culture of EC and perivascular cells (SMCs) that participate in the formation and stabilization of vessels (TRUSKEY, 2010). EC migrate and lengthen, connecting with neighboring EC, forming a network of vessels. Vessel networks contain a lumen created by the fusion of intracellular vesicles. SMCs in co-culture have the ability to produce their own basement membrane and extracellular matrix, including: IV collagen, collagen I and fibronectin, in patterns typically seen *in vivo*. In addition to the components of the MEC, cocultures also produce essential growth factors necessary to boost the formation of new vessels (BAZOU *et al.*, 2016).

Based on this, the objective of this study was to develop a prediction model of personalized therapies for human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) using biopsy samples from patients or mice *ex vivo* in vascularized tissues *in vitro*.

2. OBJECTIVES

2.1. General Objective

To develop and validate a vascularized tumor explant (VTE) platform as an *ex vivo* predictive model to evaluate the efficacy of personalized therapies against pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) using patient biopsy samples or patient-derived xenograft (PDX) models.

2.2. Specific Objectives

- a) To establish and optimize an *in vitro* co-culture system of human endothelial cells (HUVECs) and perivascular cells (SMCs) to generate stable and morphologically complex three-dimensional vascular networks that mimic the tumor microenvironment.
- b) To successfully integrate tumor components – specifically spheroids from PDAC cell lines and tumor fragments from PDX – into the established vascular networks to create a functional and representative VTE model.
- c) To evaluate the response of VTE models (based on spheroids and PDX) to a standard chemotherapy agent, gemcitabine, analyzing markers of apoptosis (cleaved caspase-3) and proliferation (Ki67).
- d) To compare the sensitivity and proliferative response to gemcitabine between VTEs generated with sensitive (1108) and resistant (1319) PDAC cell lines, validating the model's ability to reflect known drug resistance profiles.
- e) To investigate the potential of the VTE system to predict the efficacy of clinically relevant combination therapies, such as FOLFIRINOX and Gemcitabine/Nab-paclitaxel (GEM/ABX), in human tumor explants, targeting future application in neoadjuvant personalized medicine.

3. MATERIAL AND METHODS

The experiments described in this chapter were performed at the Edwin Steele Laboratories for Tumor Biology of the Department of Radiation Oncology at Massachusetts General Hospital (Boston, MA, USA). This research was conducted during a visiting research period as part of the "Doutorado Sanduíche" program, funded by the Institutional Program for Internationalization (CAPES-PrInt; Process N° 88887.802957/2023-00).

3.1. Vascular Network Formation

In vitro vascularized tissues were created by co-culturing Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs), generously donated by Boston Children's Hospital, and primary human dermal Smooth Muscle Cells (SMCs) purchased from Lonza (Walkersville, MD, USA). Per well of a 96-well plate, 10.000 HUVECs and 80.000 SMCs were seeded in 200 μ L of Vasculife® VEGF Endothelial Medium (Lifeline Cell Technology, Frederick, MD, USA). The plate was manually shaken for 30 seconds to ensure uniform cell distribution and incubated for 3 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ to allow for complete vessel formation.

3.2. SMC Immortalization

To overcome replicative senescence, SMCs were immortalized via lentiviral transduction to express human telomerase reverse transcriptase (hTERT). Lentiviral particles were produced in HEK293T cells by co-transfecting the pLV-hTERT-hygro plasmid (Addgene, #85140) with the psPAX2 (Addgene, #12260) and pMD2.G (Addgene, #12259) packaging vectors. Parental SMCs were transduced with viral supernatant in the presence of 8 μ g/mL Polybrene (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA, Cat# TR-1003-G). After 72 hours, transduced cells were selected using Hygromycin B (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA, Cat# H3274) at a concentration previously determined by a kill curve. Resistant colonies were isolated and expanded to establish a stable, continuously proliferating SMC line.

3.3. PDAC Spheroid Culture

To generate PDAC spheroids, 96-well plates were coated with a non-adherent layer of 1,5% agarose. The agarose solution (750 mg in 50 mL of DMEM/F12 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat# 11320033)) was heated until dissolved, and 50 μ L was added to each well. The plate was solidified and sterilized under UV light for 30 minutes. PDAC cells (10.000 per well) were seeded in 100 μ L of DMEM/F12 supplemented with 4% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Cat# 26140079). After 3 days of incubation to allow spheroid formation, spheroids were transferred onto the pre-formed vascular networks using a cut 200 μ L pipette tip. The co-culture was incubated for at least 2 days to allow for spheroid integration before treatment with 100 nM gemcitabine for 72 h.

3.4. Immunofluorescence Staining

Samples were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 1 hour. Following two PBS washes, cells were permeabilized with 0,5% Triton X-100 in PBS for 2 hours at 4°C. The samples were then blocked overnight at 4°C with a blocking solution (5% Normal Donkey Serum and 0.1% Triton X-100 in PBS). Primary antibodies, diluted in blocking solution, were added and incubated for 48 hours at 4°C. The wells were washed five times with PBS before adding secondary antibodies for an overnight incubation at 4°C, protected from light. The following primary antibodies were used: mouse anti-human CD31 (Clone JC70A, Dako/Agilent, M0823, 1:100), rabbit anti-human Cleaved Caspase-3 (Asp175, Cell Signaling Technology, #9661, 1:100), and rabbit anti-human Ki67 (Clone SP6, Abcam, ab16667, 1:100). The corresponding secondary antibodies were Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit and Cy3-conjugated anti-mouse (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 1:200). Nuclei were counterstained with DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 1:400). Negative controls were processed without primary antibodies. Images were acquired using an Olympus FluoView FV1000 laser scanning confocal microscope mounted on an IX81 inverted microscope (Olympus, Waltham, MA, USA), and three-dimensional visualization was achieved using 5 μ m z-stacks.

3.5. Patient-Derived Xenograft (PDX) Model

All animal procedures were performed in accordance with a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Massachusetts General Hospital. Human PDAC cell lines (1108 and 1319) were implanted orthotopically into the pancreas of C57BL/6 mice. Tumor growth was monitored by ultrasound. When tumors reached a predetermined size (~1 cm³), they were explanted and mechanically minced by passing them through a 300 µm cell strainer placed over a 100 µm strainer. Tumor fragments (100–300 µm in size) collected from the top of the 100 µm strainer were seeded onto the vascular networks and incubated for 2 days.

3.6. Viability assay

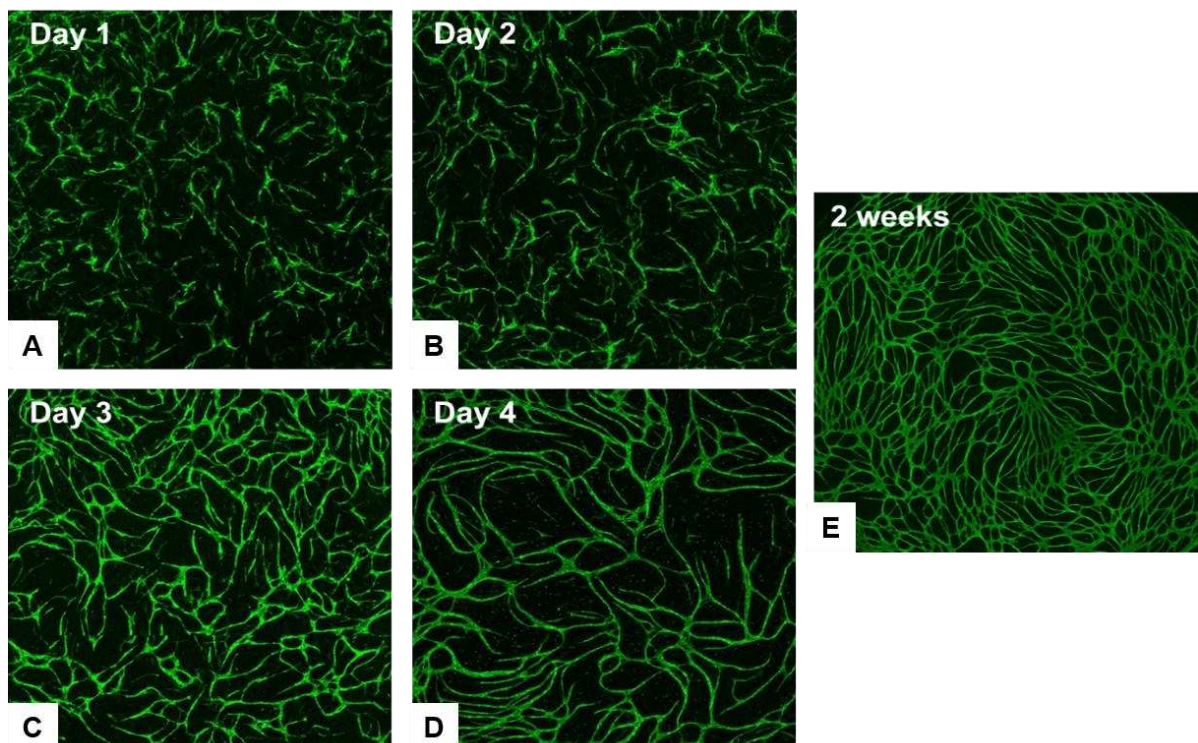
To assess the viability of PDX tumor fragments, samples were treated with gemcitabine (10, 50, 100, 500, and 1000 ng/mL) for 24 and 48 hours. Viability was measured using the Cyto3D® Live-Dead Assay Kit (TheWell Bioscience, North Brunswick, NJ, USA, Cat# CYTO3D-500) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 4 µL of the reagent was added to each well, incubated for 30 minutes, and immediately imaged by confocal microscopy. Subsequently, the samples were fixed and stained for Ki67 as described in section 1.4.

4. RESULTS

4.1. Optimization and Characterization of the Vascularized Tumor Explant (VTE) Platform

To create a robust and reproducible *in vitro* tumor microenvironment, we first optimized the formation of a stable vascular network. A co-culture ratio of 1:8 (10.000 HUVECs to 80.000 SMCs) resulted in the formation of well-defined, interconnected vascular structures positive for the endothelial marker CD31 within 3 days. These networks remained viable and structurally intact for extended periods of over two weeks with regular medium changes, demonstrating the long-term stability of the platform (Figure 34).

Figure 34 – Temporal Formation of Vascular Networks

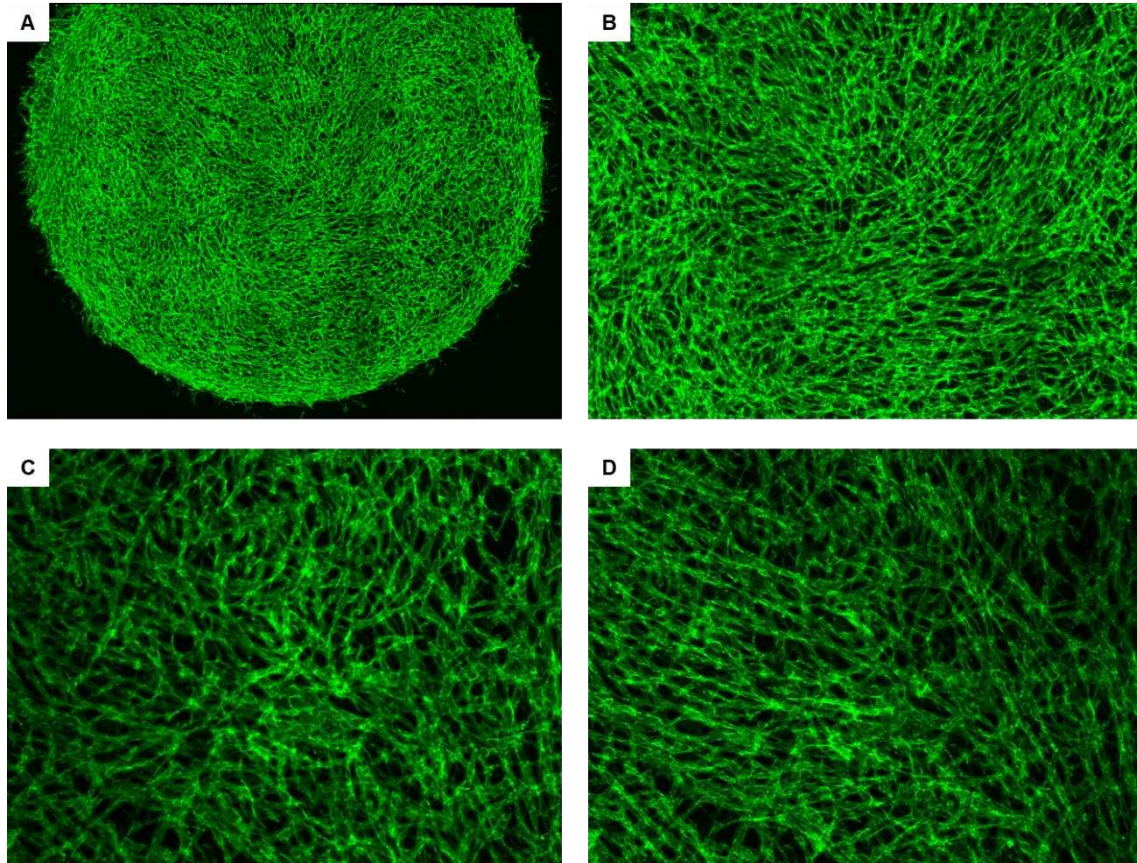


Immunofluorescence images showing CD31-positive vascular structures (green) at A) 1 day, B) 2 days, C) 3 days, D) 4 days, and E) 2 weeks post-seeding, demonstrating network maturation and stability.

Further experiments showed that higher cell seeding densities (e.g., 25.000 HUVECs to 200.000 SMCs) increased not only the density but also the

vertical height of the vascular bed, creating a more complex 3D architecture with thicker, more defined vessels (Figure 35).

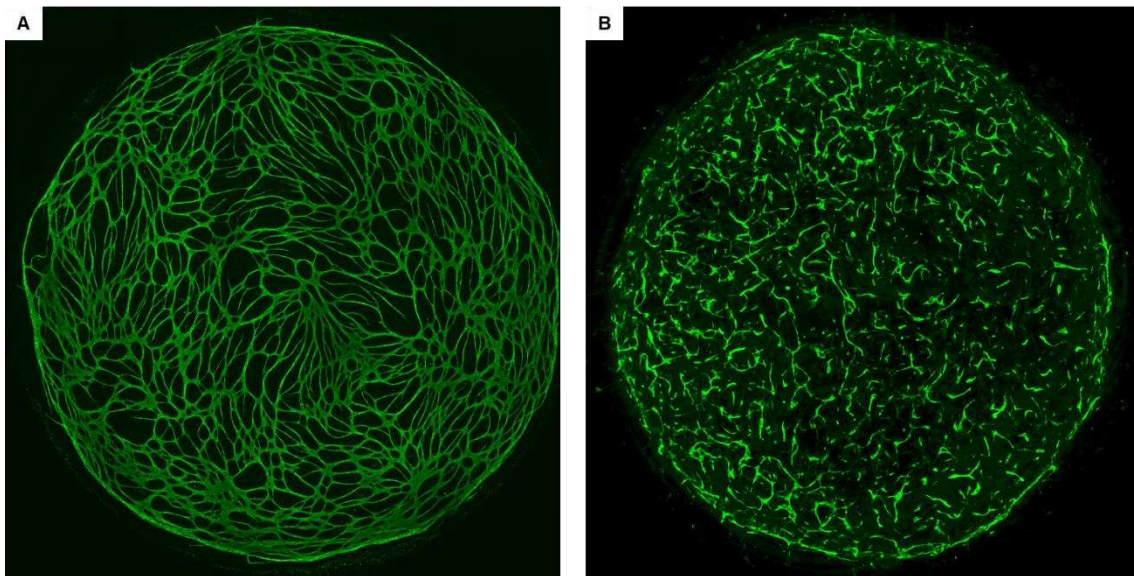
Figure 35 – High-Density Vascular Network



A) 10x projection of a high-density co-culture. B) Zoomed projection. C, D) Z-stack images showing the top and bottom layers of the network, separated by 20 μm , highlighting its 3D complexity.

A key challenge for the platform's reproducibility was the replicative senescence of primary SMCs, which lost their vessel-forming capacity after 3-4 passages. To overcome this, we immortalized the SMC line. The immortalized SMCs retained the ability to form morphologically normal vascular networks for over 14 passages, a significant improvement compared to primary cells, thus ensuring the cost-effectiveness and consistency of the model (Figure 36).

Figure 36 – Immortalization Preserves Vessel-Forming Capacity



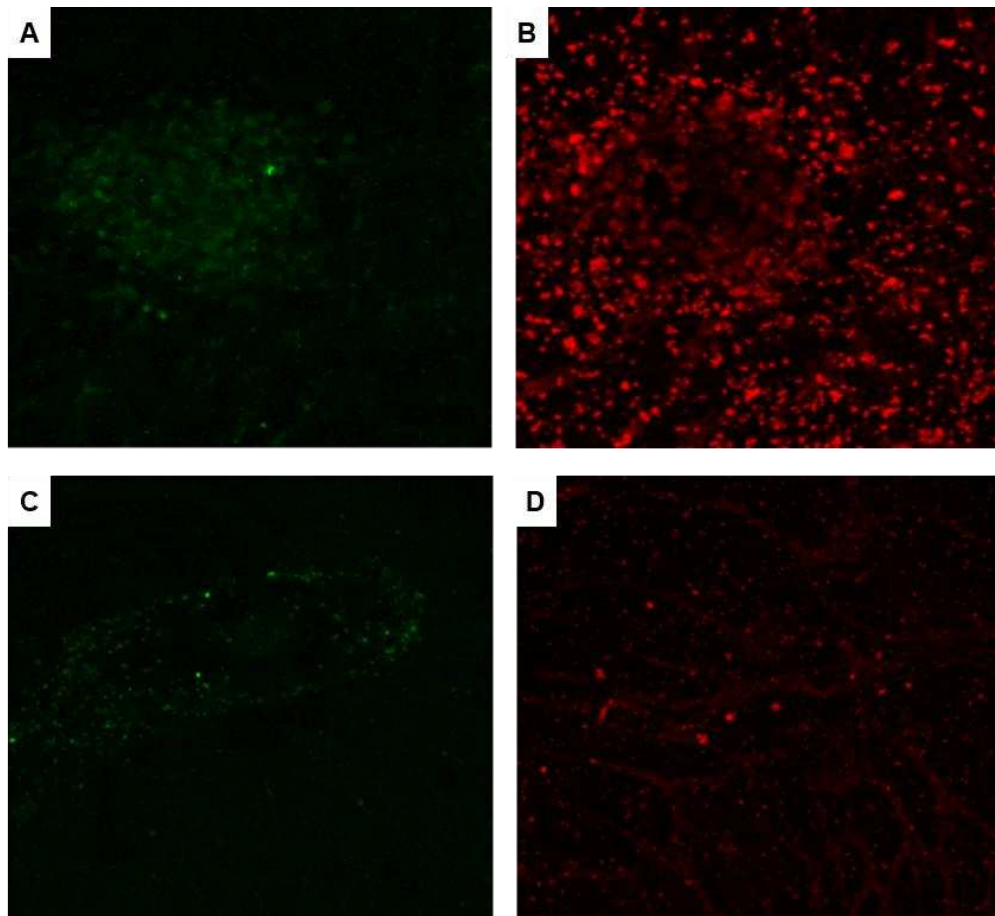
Comparison of robust vascular networks formed by A) immortalized SMCs at passage 14 and B) deteriorated structures formed by primary SMCs at passage 6.

4.2. VTE Platform Distinguishes Drug Response in PDAC Spheroid Models

To validate the VTE platform's utility for drug screening, we tested its ability to differentiate the response of gemcitabine-sensitive (1108) and gemcitabine-resistant (1319) PDAC cell spheroids. After treatment with 100 ng/mL gemcitabine, spheroids from both cell lines exhibited a strong signal for cleaved caspase-3 (CC-3), indicating widespread induction of apoptosis (Figures 37 e 38-A).

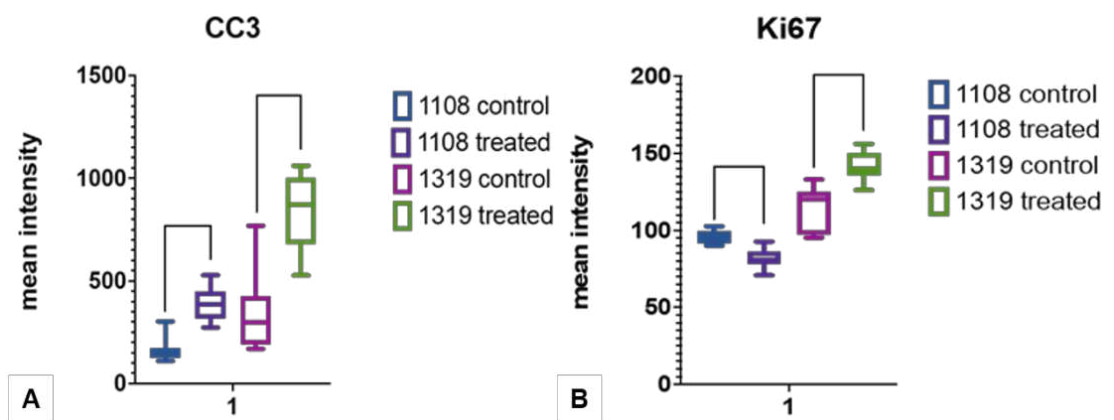
However, the proliferative response, measured by Ki67 expression, differed significantly between the lines. The sensitive 1108 spheroids showed a marked decrease in Ki67 staining, indicating cell cycle arrest. In contrast, the resistant 1319 spheroids maintained high levels of Ki67 expression, suggesting they continued to proliferate despite the drug's presence (Figures 37, 38-B). This demonstrates the platform's ability to distinguish between cytotoxic and cytostatic drug effects.

Figure 37 –Drug Response in Resistant (1319) and Sensitive (1108) Spheroids



Immunofluorescence images showing proliferation (Ki67, green) and apoptosis (CC-3, red) after gemcitabine treatment in 1319 cells (A-B) and 1108 cells (C-D).

Figure 38 – Quantification of Apoptosis and Proliferation

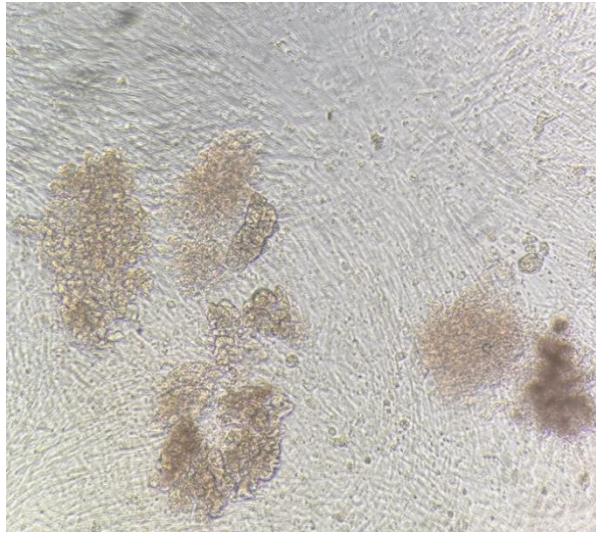


A) Both 1108 and 1319 spheroids show increased CC-3 expression. B) Ki67 expression is significantly reduced in sensitive 1108 spheroids but remains high in resistant 1319 spheroids.

4.3. Response of Patient-Derived Xenograft (PDX) Explants to Gemcitabine

We next advanced the model by incorporating more clinically relevant PDX tumor fragments (Figure 39). The response of gemcitabine-sensitive (1108) and gemcitabine-resistant (1319) PDX explants was assessed.

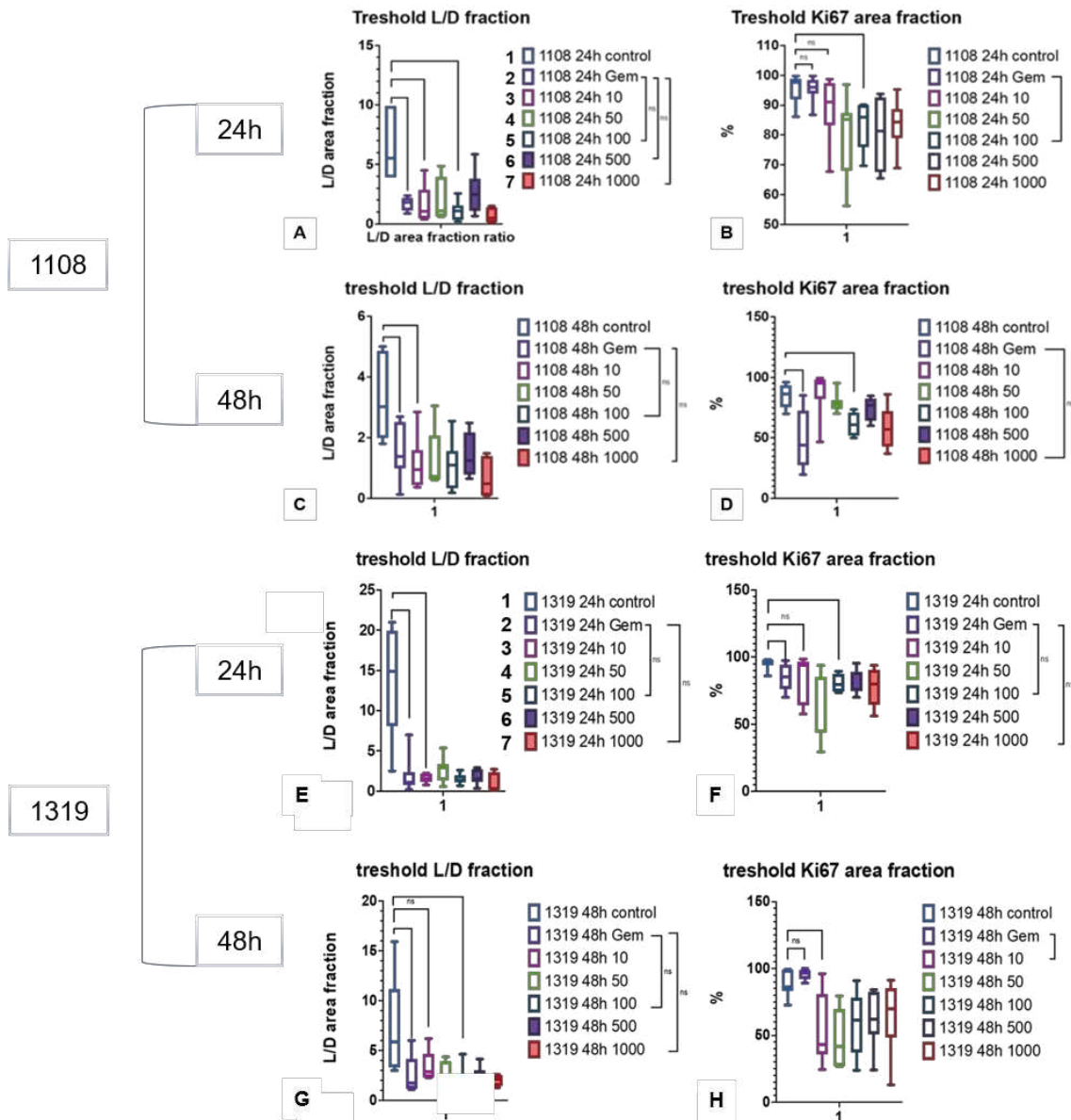
Figure 39 – PDX Tumor Fragments on the Vascular Bed



Representative image of tumor pieces of comparable size (100-300 μm) integrated into the VTE platform.

For the sensitive 1108 PDX model, gemcitabine treatment significantly reduced the fraction of viable cells at both 24 and 48 hours compared to the control. Proliferation, measured by Ki67 staining, was significantly reduced at the 48-hour time point (Figure 40).

Figure 40 – Gemcitabine Induces Differential Viability and Proliferation Responses in Sensitive (1108) and Resistant (1319) PDX Explants



Sensitive Cell Line (1108): (A) Fraction of the dead/live (L/D) cell area after 24 hours, indicating increased cell death with treatment; (B) Fraction of the Ki67-positive area (proliferation) after 24 hours; (C) Fraction of the L/D area after 48 hours, showing a sustained cytotoxic effect; (D) Fraction of the Ki67 area after 48 hours, indicating a significant reduction in proliferation. Resistant Cell Line (1319): (E) Fraction of the L/D area after 24 hours; (F) Fraction of the Ki67 area after 24 hours, showing a lesser impact on proliferation compared to the sensitive cell line; (G) Fraction of the L/D area after 48 hours; (H) Fraction of the Ki67 area after 48 hours, indicating a recovery or maintenance of proliferative capacity. Box-and-whisker plots represent the median, quartiles, and minimum and maximum values of multiple samples. The Ki67 area fraction is presented as a normalized percentage relative to the control group. Curly brackets indicate statistical comparisons between groups (ns = not significant; the absence of "ns" implies statistical significance, $p < 0.05$).

5. DISCUSSION

In this study, we successfully developed, optimized, and validated a vascularized tumor explant (VTE) platform for evaluating anti-cancer drug efficacy. Our results demonstrate that this *ex vivo* model recapitulates key aspects of the tumor microenvironment and can differentiate between sensitive and resistant cancer cell responses.

A critical advancement of our platform is its reproducibility and long-term stability. By immortalizing the SMCs, we overcame the limitations of primary cell senescence, creating a consistent and cost-effective system suitable for scalable drug screening. Furthermore, the ability to generate denser, more complex 3D vascular beds allows for a more physiologically relevant microenvironment compared to standard 2D or spheroid cultures.

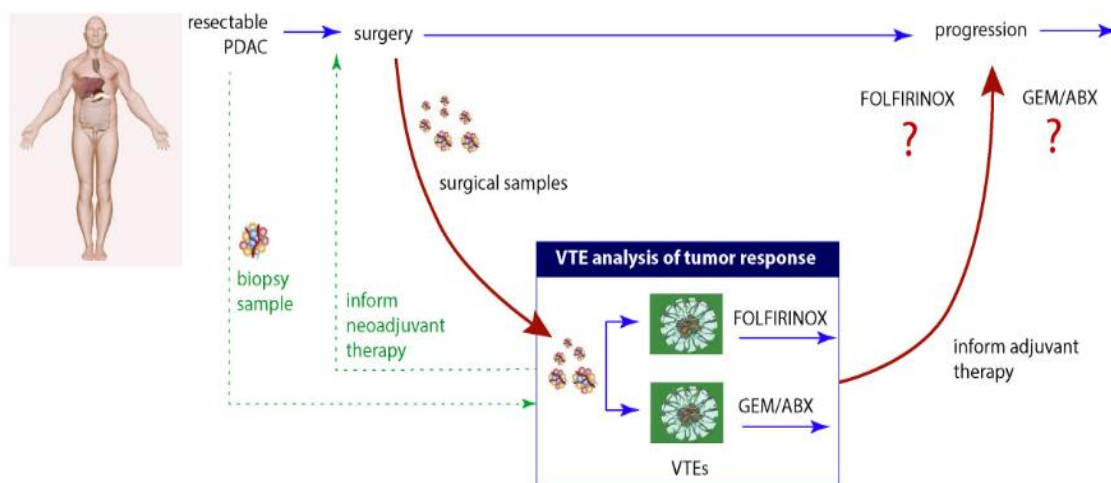
The validation using PDAC spheroids highlights the platform's sensitivity. While gemcitabine induced apoptosis (high CC-3) in both sensitive and resistant lines, the key differentiator was the proliferative escape of the resistant 1319 cells, which maintained high Ki67 levels. This suggests our VTE system can effectively distinguish between a drug's cytotoxic effects and resistance mechanisms linked to continued cell proliferation, a crucial aspect for evaluating therapy success.

The application of the VTE platform to PDX tissues represents a significant step towards clinical translation. While more complex, the results from PDX explants provide a glimpse into the heterogeneous response of patient-derived tissue. The observation that both sensitive and resistant PDX models showed reduced viability suggests a baseline cytotoxic effect of gemcitabine, but the nuanced differences in proliferation over time may hold the key to predicting long-term response.

Finally, we addressed a major technical hurdle in working with explanted tissue: obtaining uniformly sized fragments without compromising viability. Our novel filter-stacking protocol is a simple yet effective methodological innovation that improves upon traditional techniques and enables the reliable processing of heterogeneous tumor tissue for *ex vivo* analysis.

In conclusion, this work establishes a robust VTE platform that serves as a powerful tool for preclinical drug evaluation. The future integration of patient-derived surgical tissues, as proposed (Figure 41), holds immense potential for personalized medicine, allowing for the prediction of patient-specific responses to therapies like FOLFIRINOX and GEM/ABX and guiding neoadjuvant treatment decisions for PDAC.

Figure 41 – Proposed translational application of the Vascularized Tumor Explant (VTE) platform to guide personalized therapy for resectable pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC).



The diagram illustrates how ex vivo tumor response analysis can be integrated into the patient's clinical pathway to optimize treatment. Blue Pathway (Standard Treatment): Represents conventional treatment, in which the patient undergoes surgery and, after recovery, receives adjuvant (post-surgical) chemotherapy, such as FOLFIRINOX or GEM/ABX. Treatment choice is empirical, based on general guidelines, to treat potential disease progression. Red Pathway (Personalized Adjuvant Therapy): Demonstrates the platform's primary application. Tumor samples resected during surgery are cultured in the VTE system and exposed to different chemotherapy regimens. The results of the VTE analysis predict which treatment (FOLFIRINOX or GEM/ABX) will be most effective for a given patient, thus informing the choice of adjuvant therapy to prevent recurrence. Green Route (Personalized Neoadjuvant Therapy): Illustrates a future application. A biopsy sample is collected before surgery. The ex vivo tumor response in the VTE system informs the choice of the most effective neoadjuvant (pre-surgical) therapy, with the goal of reducing tumor size before resection and treating micrometastases early.

6. REFERENCES

BAZOU, D.; MAIMON, N., GRUIONU, G.; MUNN, L. L. Self-assembly of vascularized tissue to support tumor explants in vitro. **Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro**, (2016). v. 8, n. 12, p. 1301–1311. doi:10.1039/c6ib00108d

CHO, S.; LEE, S.; AHN, S. I. Design and engineering of organ-on-a-chip. **Biomedical engineering letters**, (2023). v. 13, n. 2, p. 97–109. doi:10.1007/s13534-022-00258-4

JAIN, R.K.; MARTIN, J.D.; STYLIANOPOULOS, T. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: Bench to bedside to biomarkers. **Journal of Clinical Oncology**, (2013), v.31, n. 17. p. 2205–18. doi:10.1200/JCO.2012.46.3653

LILLY, B. We Have Contact: Endothelial Cell-Smooth Muscle Cell Interactions. **Physiology**, (2014), v. 29, n. 4, p. 216-298. doi:0.1152/physiol.00047.2013

MARTIN, J. D.; SEANO, G.; JAIN, R. K. (2019). Normalizing Function of Tumor Vessels: Progress, Opportunities, and Challenges. **Annual review of physiology**, v. 81, p. 505–534. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114700

SHIMPI, A. A.; FISCHBACH, C. Engineered ECM models: Opportunities to advance understanding of tumor heterogeneity. **Current Opinion in Cell Biology**, (2021), v. 72, p. 1-9. doi: 10.1016/j.ceb.2021.04.001

TRUSKEY G. A. Endothelial Cell Vascular Smooth Muscle Cell Co-Culture Assay For High Throughput Screening Assays For Discovery of Anti-Angiogenesis Agents and Other Therapeutic Molecules. **International journal of high throughput screening**, (2010) v. 1, p. 171–181. doi:10.2147/IJHTS.S13459

CONCLUSÃO GERAL

A presente tese partiu do duplo desafio que define a oncologia moderna: a busca por agentes terapêuticos mais seletivos e o desenvolvimento de modelos pré-clínicos fidedignos à resposta clínica. Através de uma jornada metodológica progressiva, este trabalho demonstrou a importância da complexidade dos modelos experimentais, avançando desde a prospecção de bioativos em sistemas convencionais até a criação de uma plataforma avançada com aplicação direta na medicina de precisão.

O primeiro capítulo estabeleceu o ponto de partida, demonstrando o robusto potencial anticarcinogênico de OEs em modelos de cultura 2D. A investigação revelou não apenas uma potente citotoxicidade, mas também uma notável seletividade, com destaque para o óleo de camomila contra o carcinoma hepatocelular (IS > 77) e o de noz-moscada contra o câncer de mama (IS > 13). Estes achados validaram os produtos naturais como fontes promissoras, mas, ao mesmo tempo, expuseram as limitações de um modelo que não captura a arquitetura tridimensional de um tumor.

No segundo capítulo, a transição para um modelo de esferoides 3D, permitiu desvendar um mecanismo de ação mais sofisticado. Revelou-se que o provável efeito antitumoral dos OEs não seja apenas a citotoxicidade direta, mas sim a desestabilização da arquitetura do agregado via quebra da adesão célula-célula. Esta descoberta, impossível de ser observada em monocamada, foi mecanisticamente embasada pela literatura, que correlaciona os principais constituintes dos óleos (α -Bisabolol, Cinamaldeído e Miristicina) à inibição da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, um regulador chave de proteínas de adesão como a E-caderina. Isso enfatizou como a complexidade do modelo é fundamental para elucidar mecanismos que vão além da simples morte celular, aproximando-se da fisiopatologia tumoral *in vivo*.

Finalmente, o terceiro capítulo, apresentou o desenvolvimento e a validação de uma plataforma de explantes tumorais vascularizados (VTE). Ao aplicar este sistema ao desafio clínico do adenocarcinoma ductal pancreático, demonstrou-se sua capacidade de diferenciar mecanismos de resistência a

Conclusão Geral

quimioterápicos, distinguindo a fuga proliferativa da citotoxicidade em modelos derivados de pacientes. Este capítulo consolidou a filosofia central da tese: a criação de modelos preditivos é uma ferramenta poderosa para responder a questões clinicamente relevantes.

Em conjunto, este trabalho contribui para a oncologia translacional em duas frentes complementares. Por um lado, apresenta candidatos a fitoterápicos com alta seletividade, cujos mecanismos de ação foram aprofundados pela aplicação de modelos 3D. Por outro, entrega uma plataforma *ex vivo* validada, com potencial para guiar a terapia personalizada e otimizar as decisões clínicas. A jornada do bioativo natural ao modelo avançado reforça que o futuro da descoberta de fármacos contra o câncer reside na sinergia entre a riqueza química da natureza e o rigor de sistemas experimentais que verdadeiramente mimetizem a biologia humana.