

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da
atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10)
e não neoplásicas (MDBK)**

Cristine Cioato da Silva

Pelotas, 2016

Cristine Cioato da Silva

Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Marlete Brum Cleff

Co-orientador: Geferson Fischer

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586e Silva, Cristine Cioato da

Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK) / Cristine Cioato da Silva. – 88f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2016. – Orientador Marlete Brum Cleff; co-orientador Geferson Fischer.

1.Veterinária. 2. Câncer animal. 3.Plantas medicinais.
4.Extratos vegetais. 5.Melanomas cutâneos. I.Cleff, Marlete Brum. II. Fischer, Geferson. III. Título.

CDD: 636.0896994

Cristine Cioato da Silva

Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/02/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Marlete Brum Cleff (Orientador)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr^a. Cristina Gevehr Fernandes
Doutora em Patologia pela Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr^a. Ana Raquel Mano Meinerz
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

**A todos os animais que lutam bravamente contra
o câncer.**

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar, Àquele que deu origem a tudo, que tudo vê e que certamente me acompanha sempre.

À minha família, a quem dedico essa conquista, agradeço pela preocupação, pelo amor, pelo carinho e, principalmente, por acreditarem tanto no meu sucesso, mesmo nos momentos em que até eu duvidava.

Ao meu namorado Thomas, agradeço pela presença em mais essa etapa da minha trajetória acadêmica. Mais do que isso, agradeço pela participação ativa em todas as etapas, pelo incentivo e pelo apoio, sem os quais tudo teria sido muito mais difícil. Pelo carinho e pela paciência, muito obrigada!

Às amigas do coração, Claudinha, Karina e Carol, agradeço por terem alegrado tanto os meus dias. De muitas maneiras, vocês tornaram essa caminhada muito mais leve e prazerosa.

À minha orientadora Marlete, sou grata pelas lições acadêmicas e, mais do que isso, agradeço pelas lições diárias de perseverança e pelo incentivo trazido em forma de bom humor e otimismo inabaláveis.

Agradeço aos meus colegas Claudia Giordani e Tony Picoli, por terem sempre encontrado tempo para mim e para as minhas dúvidas. Obrigada pela paciência e pela compreensão.

Ao meu co-orientador, professor Geferson Fischer e a todas as pessoas que compõem o LABVIR-UFPel, agradeço por abraçarem o meu projeto junto comigo, disponibilizando um pouco de seu tempo para me auxiliar e me orientar no que fosse necessário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), aos demais órgãos financiadores CNPq e FAPERGS, ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária, professores, alunos e servidores da Faculdade de Veterinária, obrigada por tudo.

Resumo

SILVA, Cristine Cioato. **Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK)**. 2016. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

O melanoma apresenta grande importância na oncologia veterinária por ser um tumor invasivo, altamente metastático e pouco responsivo ao tratamento quimioterápico convencional. Impulsionadas pela resistência neoplásica aos fármacos, as pesquisas com produtos naturais tem recebido atenção especial nos últimos anos, pois esses são promissores agentes para prevenção e tratamento do câncer. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade citotóxica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* e dos extratos hidroalcóolicos de *Origanum vulgare*, *Schinus terebinthifolius*, *Eugenia uniflora* e *Bauhinia forficata* frente à linhagem celular de melanoma murino B16F10 e de rim bovino - MDBK (Madin Darby Bovine Kidney), além de fazer uma retrospectiva de melanomas em cutâneos em cães atendidos no HCV. Os óleos essenciais foram obtidos através de arraste de vapor em Clevenger, sendo testados nas concentrações de 6,25 a 0,024 mg.mL⁻¹ e os extratos hidroalcóolicos através de rotaevaporador, sendo testados nas concentrações de 6,25 a 0,02 mg mL⁻¹. As diluições dos óleos e dos extratos foram distribuídas em placas de 96 poços, sob as monocamadas de células das linhagens B16F10 e MDBK, que foram incubadas por 24 e 48 horas, em 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT e a leitura feita em espectrofotômetro (540nm) em dois tempos (24 e 48 horas). Todos os óleos avaliados foram efetivos em inibir as células de melanoma, porém não houve diferença significativa entre eles e entre suas concentrações, assim como em relação a citotoxicidade na linhagem MDBK. As concentrações efetivas e não tóxicas dos óleos essenciais de *O. majorana* e *O. vulgare* foram 490 e 245 µg.mL⁻¹. O óleo de *R. officinalis*, apresentou elevada toxicidade nas concentrações efetivas nas células B16F10. Os compostos majoritários identificados foram 1-8 cineol, canfora e α-pinene, no óleo essencial de *R. officinalis*; 4-terpineol, 4-carene e 5-isopropyl-2-methylbicyclo no óleo essencial de *O. majorana* e γ-terpineno, 4-terpineol e hidroxy-p-cymene no óleo essencial de *O. vulgare*. Os extratos avaliados apresentaram atividade antiproliferativa em células tumorais e normais dependente do tempo e da dose, tendo maiores porcentagens de inibição celular em 48 horas do que em 24. Os extratos hidroalcóolicos de *B. forficata*, *E. uniflora* e *O. vulgare* em 48 horas, apresentaram os melhores resultados antiproliferativos em células de melanoma, uma vez que atingiram moderada atividade inibitória nas células B16F10 em concentrações com baixa toxicidade para as células MDBK. O extrato de *S. terebinthifolius* não exibiu atividade satisfatória nas células tumorais, quando cruzadas as concentrações efetivas e tóxicas. Assim,

conclui-se que os óleos essenciais de *O. majorana* e de *O. vulgare* e os extratos hidroalcoólicos de *Origanum vulgare*, *Eugenia uniflora* e *Bauhinia forficata* apresentam melhor atividade antiproliferativa *in vitro* em células de melanoma, quando comparados ao óleo essencial *R. Officinalis* e o extrato hidroalcoólico de *S. terebinthifolius*, e representam promissoras fontes de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos. Os melanomas cutâneos são frequentes na rotina do HCV, estando o seu comportamento biológico relacionado principalmente com o tamanho do tumor e a presença de metástases.

Palavras-chave: plantas medicinais; extratos vegetais; óleos essenciais; toxicidade; melanomas cutâneos

Abstract

SILVA, Cristine Cioato. **Retrospective study of canine cutaneous melanomas and determine the cytotoxic activity of plant products against neoplastic (B16F10) and non-neoplastic cells (MDBK)**. 2016.88f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Melanoma has great importance in veterinary oncology due to their capacity of invasion, highly metastatic and poorly responsive to conventional chemotherapy treatment. Powered by neoplastic drug resistance, researches of natural products have received special attention in recent years, probably because they are promising agents for the prevention and treatment of cancer. The objective of the study was to evaluate the cytotoxic activity of essential oils of *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* and *Rosmarinus officinalis* and the hydroalcoholic extracts of *Origanum vulgare*, *Schinus terebinthifolius*, *Eugenia uniflora* and *Bauhinia forficata* against the cell line of murine melanoma B16F10 and kidney veal - MDBK (Madin Darby bovine Kidney), and make a retrospective of skin melanomas in dogs treated at the HCV.). The essential oils were obtained by dragging a water steam by using a Clevenger apparatus, and they were tested at concentrations from 6.25 to 0.024 mg.mL⁻¹ and hydroalcoholic extracts through rotaevaporator being tested at concentrations of from 6.25 to 0.02 mg mL⁻¹. Dilutions of oils and extracts were distributed in 96-well plates in cell monolayers of MDBK and B16F10 lines which were incubated for 24 and 48 hours at 37°C in humid atmosphere, 5% CO₂. Cell viability was assessed by MTT assay and the result was analyses using a spectrophotometer (540nm) in two stages (24 and 48 hours). All oils tested were effective in inhibiting melanoma cells, but there was no significant difference between them and between their concentrations, as well as in relation to cytotoxicity in MDBK line. Effective and non-toxic concentrations of the essential oil of *O. majorana* and *O. vulgare* were 490 and 245 µg.mL⁻¹. The essential oil of *R. officinalis* showed high toxicity at effective concentrations in B16F10 cells. The majors compounds identified were 1-8 cineol, camphor and α-pinene in essential oil of *R. officinalis*; 4-terpineol, 4-Carene and 5-isopropyl-2-methylbicyclo in essential oil of *O. majorana* and γ-terpinene, 4-terpineol and Hydroxy-p-cymene in essential oil of *O. vulgare*. The extracts tested showed antiproliferative activity on tumor and normal cells dependent on time and dose, with higher percentages of cellular inhibition at 48 hours than at 24 hours. The hydroalcoholic extracts of *B. forficata* *E. uniflora* and *O. vulgare* showed, in 48 hours, the best anti-proliferative outcome in melanoma cells, once they reached moderate inhibitory activity on B16F10 cells at concentrations with lower toxicity to MDBK cells.

The extract of *S. terebinthifolius* did not exhibited satisfactory activity in tumor cells, when crossed the effective and toxic concentrations. Thus, it is concluded that the essential oil of *O. majorana* and *O. vulgare* and the hydroalcoholic extracts of *Origanum vulgare*, *Eugenia uniflora* and *Bauhinia forficata* have better antiproliferative activity *in vitro* in melanoma cells, when compared to the essential oil *R. officinalis* and the hydroalcoholic extract of *S. terebinthifolius* and they represent a promising study sources for the development of new anticancer drugs. Cutaneous melanomas are common in routine HCV, being your biological behavior mainly related with tumor size and metastasis.

Keywords: medicinal plants; plant extracts; essencial oils; toxicity; cutaneous melanomas

Lista de Figuras

Artigo 1 Atividade citotóxica de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae em células de melanoma

- Figura 1 Gráfico demonstrando a viabilidade das células das linhagens testadas, onde as colunas representam a atividade dos óleos essenciais em células B16F10 e as linhas, em células MDBK..... 41

Artigo 2 Efeito antiproliferativo e toxicidade *in vitro* de extratos hidroalcóolicos de plantas medicinais em células de melanoma

- Figura 1 Demonstração da viabilidade celular após 24 horas de contato com os extratos, onde as colunas representam a atividade dos extratos em células B16F10 e as linhas, em células MDBK..... 56
- Figura 2 Demonstração da viabilidade celular após 48 horas de contato com os extratos, onde as colunas representam a atividade dos extratos em células B16F10 e as linhas, em células MDBK..... 56

Artigo 3 Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos

- Figura 1 Sistema de estadiamento para tumores epidermais e dermais de cães e gatos utilizado no estudo, proposto pela Organização Mundial da Saúde..... 67
- Figura 2 Diferentes localizações primárias e linfonodos metastáticos de melanomas cutâneos..... 68
- Figura 3 Linfonodos regionais de pacientes com melanoma cutâneo, apresentando características macroscópicas de metástase..... 69
- Figura 4 Curva de sobrevida referente aos 15 pacientes nos quais foi realizado o acompanhamento pós-cirúrgico..... 69

Lista de Tabelas

Artigo 1 Atividade citotóxica de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae em células de melanoma

Tabela 1	Concentrações de óleos essenciais de <i>O. vulgare</i> , <i>O. majorana</i> e <i>R. officinalis</i> que demonstraram atividade antiproliferativa na linhagem B16F10 e baixa toxicidade em células MDBK	40
----------	--	----

Artigo 2 Efeito citotóxico *in vitro* de extratos hidroalcóolicos de plantas medicinais em células de melanoma

Tabela 1	Médias da viabilidade celular da linhagem B16F10 obtida por cada extrato, em diferentes concentrações em 24 e 48 horas.....	54
Tabela 2	Médias da viabilidade celular da linhagem MDBK obtida por cada extrato, em diferentes concentrações em 24 e 48 horas.....	55

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Objetivos.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 Revisão de Literatura.....	16
4 Artigos.....	35
4.1 Artigo 1.....	35
4.2 Artigo 2.....	50
4.3 Artigo 3	64
5 Considerações Finais.....	73
Referências.....	74

1 Introdução

A Organização Mundial de Saúde aponta o câncer como uma das principais causas de mortalidade em humanos no mundo, sendo crescente o número de novos casos (WHO, 2008). No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontaram para uma ocorrência de aproximadamente 580 mil novos casos da doença (INCA, 2014). Dados semelhantes são observados na medicina veterinária, onde os neoplasmas são considerados como uma das maiores causas de morbidade e de mortalidade entre cães e gatos idosos (WITHROW et al., 2013).

Dentre os neoplasmas que podem acometer caninos e felinos, os de origem cutânea são os mais prevalentes, correspondendo a aproximadamente 43% das ocorrências, sendo que a porcentagem de malignidade varia entre 20 a 40%, destacando-se nesta categoria os melanomas (ROLIM et al., 2012; BROCKLEY et al., 2013; HAUCK, 2013; SMEDLEY et al., 2014).

O melanoma é uma neoplasia formada a partir de mutações em células produtoras de melanina (melanócitos e melanoblastos). Apesar de não ter uma alta frequência, o melanoma tem grande importância na oncologia veterinária por tratar-se de um tumor invasivo e altamente metastático, principalmente quando está situado nos dígitos e na cavidade oral (ROLIM et al., 2012; BERGMAN et al., 2013). Outros locais de ocorrência do melanoma são a pele, junções mucocutâneas e o globo ocular (BERGMAN et al., 2013).

Dentre as modalidades terapêuticas que podem ser aplicadas em pacientes portadores de melanomas, destacam-se a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. A escolha da terapia, assim como a determinação do prognóstico, depende da localização, do tamanho e do estágio do tumor, além da presença de metástases (BERGMAN et al., 2013). A ressecção cirúrgica com margens amplas é recomendada e pode ser a única modalidade terapêutica adotada em animais portadores de massas pequenas, pouco invasivas, não aderidas e sem metástases. A quimioterapia e a radioterapia adjuvantes podem ser aplicadas nos pacientes em que foram detectadas metástases e/ou nos quais a ressecção completa da massa não foi possível (BERGMAN, 2007). Porém, não há evidências claras de que a

quimioterapia para o melanoma, empregada como terapia única ou adjuvante, reduza o risco de metástases ou de recorrência do tumor, assim como também parece não prolongar o tempo médio de sobrevivência dos pacientes (BERGMAN et al., 2013). Outro contraponto da quimioterapia são os efeitos colaterais causados pela sua administração, pois a maioria desses fármacos não apresenta toxicidade seletiva às células tumorais, atingindo também as células normais do organismo do paciente, causando danos a diversos tecidos e funções orgânicas.

Dessa forma, se faz necessária a descoberta de novas opções de tratamento, com características aprimoradas (ARAÚJO et al., 2007). Nesse contexto, as plantas medicinais têm sido apontadas como uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos (BREHMER, 2005).

Em humanos, estima-se que 60% dos pacientes oncológicos utilizam algum tipo de terapia alternativa ao longo do curso da doença, além das modalidades convencionais citadas (ARAÚJO et al., 2007). No século XX houve um grande avanço na pesquisa de substâncias utilizadas na terapêutica antineoplásica, sintetizadas a partir de produtos naturais como plantas e microrganismos (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Estima-se que 60% dos fármacos antineoplásicos e antimicrobianos introduzidos no mercado nas últimas décadas, são originados de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2012).

As plantas da família Lamiaceae destacam-se nesse contexto, por serem ricas em substâncias antioxidantes. Muitas espécies pertencentes a essa família estão sendo amplamente testadas quanto à sua atividade antimicrobiana e vêm apresentando resultados promissores (CLEFF, 2008; SANTIN et al., 2014). Os extratos e óleos essenciais obtidos de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum marjorana* e *Origanum vulgare*, todas pertencentes à família Lamiaceae, já demonstraram ação antiproliferativa frente a diversas linhagens de células tumorais humanas e animais de melanoma, insulinoma, câncer de mama, câncer de colo uterino e fibrossarcoma (SAVINI et al., 2009; KONTOGIANNI et al., 2013; RAO et al., 2014; CATTANEO et al., 2015).

Outras plantas popularmente utilizadas como *Bauhinia forficata*, *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, tem sido avaliadas cientificamente. *B. forficata* tem sido amplamente utilizada pela população devido à ação hipoglicemiante, antibacteriana, fungicida, antidiarreica, antiviral, analgésica e até antitumoral comprovadas pela literatura (SILVA & FILHO, 2002; SOUZA et al, 2010; PEPATO et

al, 2004; MENEZES et al, 2007). Enquanto os extratos hidroalcoólicos obtidos das folhas de *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora*, demonstraram atividade antimicrobiana frente a diversas cepas de bactérias e de fungos de importância na medicina, e vem apresentando resultados promissores no que se refere à sua atividade antitumoral, principalmente quando testados seus compostos ativos isolados (GONÇALVES et al., 2005; MATSUO et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; BEZERRA et al., 2012; GREATTI et al., 2014).

Conforme o exposto se faz necessária a descoberta de novos princípios ativos que apresentem atividade antineoplásica, sendo as plantas medicinais acima apresentadas uma fonte importante de pesquisa.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade citotóxica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* e dos extratos hidroalcoólicos de *Origanum vulgare*, *Schinus terebinthifolius*, *Eugenia uniflora* e *Bauhinia forficata* frente à linhagem celular de melanoma murino B16F10 e de rim bovino (Madin Darby Bovine Kidney).

2.2 Objetivos Específicos

- Testar a atividade citotóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *R. officinalis*, *O. vulgare* e *O. majorana* frente à linhagem B16F10, originada de melanoma metastático de rato *Mus musculus*;
- Testar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos de *S. terebinthifolius*, *E. uniflora* e *B. forficata* frente à linhagem B16F10, originada de melanoma cutâneo de rato *Mus musculus*;
- Testar a citotoxicidade *in vitro* dos óleos essenciais de *R. officinalis*, *O. vulgare* e *O. majorana* e dos extratos hidroalcoólicos de *O. vulgare*, *S. terebinthifolius*, *E. uniflora* e *B. forficata* em células MDBK;
- Identificar os compostos majoritários dos óleos essenciais de *R. officinalis*, *O. vulgare* e *O. majorana*;
- Apresentar um estudo retrospectivo a cerca dos casos de melanoma cutâneo diagnosticados em caninos no HCV-UFPel, incluindo dados epidemiológicos, clínicos, terapêuticos e de sobrevida.

3 Revisão de Literatura

3.1 Conceito e Incidência do Melanoma Canino

Os neoplasmas de comportamento biológico maligno formados a partir de melanócitos são denominados melanoma, melanoma maligno ou, menos comumente, de melanossarcoma (EHRHART et al., 2013).

Estudos retrospectivos realizados no Rio Grande do Sul demonstraram que o melanoma representa de 3,3 a 3,9% das neoplasias cutâneas que acometem caninos (SOUZA et al., 2006; MEIRELLES et al., 2010), já a literatura internacional, aponta uma frequência que varia de 4 até 20% (BERGMAN et al., 2013).

Cães das raças Schnauzer, Scottish terrier e de raças pequenas, especialmente o Poodle e o Cocker Spaniel parecem ter um maior risco de desenvolver melanoma maligno (DOBSON, 2013). São citados ainda os cães sem raça definida, o Dachshund, o Labrador e o Golden Retriever como tendo uma alta ocorrência da neoplasia (MEIRELLES et al., 2010; ; ESPLIN, 2014; TUOHY et al., 2014). Porém, alguns autores concordam que pode haver períodos de super-representação de algumas raças, o que pode influenciar no resultado dos estudos (ESPLIN, 2014). Contudo, independente da raça, há um risco aumentado para o desenvolvimento de melanomas em cães que tenham a pele e/ou as mucosas pigmentadas (SMITH et al., 2002; LIU et al., 2011; DOBSON, 2013).

A literatura não é unânime quanto à existência de uma predisposição sexual para a ocorrência do melanoma, porém parece haver um maior número de casos relatados em machos, sendo 10 anos a idade média dos animais no momento do diagnóstico (SMITH et al., 2002; MEIRELLES et al., 2010; BROCKLEY et al., 2013; ROLIM et al., 2012; BOSTON et al., 2014).

3.2 Comportamento Biológico e Fatores Prognósticos

O melanoma canino é uma neoplasia de comportamento agressivo, potencialmente invasivo e metastático (RAMOS-VARA et al., 2000). Porém, o

potencial de malignidade do neoplasma é bastante variável, e depende da localização anatômica, do tamanho, da presença de metástases e das características histopatológicas do tumor (BERGMAN, 2007; BROCKLEY et al., 2013). Essas variáveis também estão diretamente relacionadas ao prognóstico da doença, enquanto o sexo, a raça e a idade dos animais parecem não ter influência (SMEDLEY, 2011; ROLIM et al., 2012).

Em relação à sua localização anatômica primária, o melanoma pode ser oral, cutâneo, mucocutâneo, digital e, menos comumente, ocular (BERGMAN, 2007; ROLIM et al. 2012; BERGMAN et al., 2013). A localização anatômica é apontada em vários estudos como um fator prognóstico importante, porém não deve ser o único fator preditivo a ser considerado (BERGMAN, 2007; SMEDLEY et al. BERGMAN et al., 2013; SMEDLEY et al., 2014). Nesse contexto, os melanomas da cavidade oral e lábios são considerados como neoplasmas de comportamento mais agressivo e pior prognóstico, quando comparados com aqueles localizados na pele (BERGMAN et al., 2013; BROCKLEY et al., 2013; SMEDLEY et al., 2014; TUOHY et al., 2014). Dentre os melanomas cutâneos, aqueles localizados nos dígitos parecem apresentar um pior prognóstico (SMEDLEY et al., 2014).

Spangler & Kass (2006) em estudo retrospectivo, demonstraram que o tempo médio de sobrevida foi maior nos animais portadores de melanomas cutâneos (725 dias), em comparação aos que tiveram a neoplasia no interior da cavidade oral (147 dias) ou nos membros e lábios (676 dias). Ainda nesse estudo, dentre os pacientes diagnosticados com melanomas malignos orais, a maioria apresentou metástase ou recorrência do tumor (59%), além de um maior número de óbitos por causas relacionadas ao tumor no período avaliado (68% em pacientes com melanomas orais, 30% em membros e lábios e 7% na pele) (SPANGLER & KASS, 2006). Outro estudo demonstrou que mais da metade dos cães que apresentaram melanoma no leito ungueal e nos lábios, vieram a óbito em menos de um ano após o tratamento cirúrgico, enquanto nos casos de melanoma cutâneo em outras localizações que não os dígitos, pouco mais da metade apresentou sobrevida superior (SCHULTHEISS, 2006).

Ainda que os tumores localizados na pele, sem envolvimento de mucosas ou dos dígitos, apresentem melhor prognóstico, é fundamental realizar o exame histopatológico de todos os melanomas, para determinação do comprometimento

das margens e das características celulares e, dessa forma, delinear o comportamento biológico do tumor (BERGMAN et al., 2013).

O estadiamento clínico consiste na classificação prognóstica dos neoplasmas, considerando o tamanho destes, presença de metástases em linfonodos regionais e presença de metástases distantes (BERGMAN et al., 2013). No caso dos melanomas orais caninos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propõe um sistema de classificação do tumor em graus ou estágios, variando de I a IV (OWEN, 1980; BERGMAN et al., 2013). Seguindo esse sistema, Kawabe et al. (2015) observaram que a sobrevida foi menor nos animais em estágios mais avançados, havendo diferença significativa no tempo médio de sobrevida entre os cães em estágio I e os cães em estágios II, III e IV e entre os cães em estágio II e IV. Ao final do mesmo estudo, houve mais cães vivos em estágio I do que nos demais (estágio I: 8/11; estágio II: 3/19; estágio III: 2/20; estágio IV: 2/16) (KAWABE et al., 2015). O intervalo livre de doença também parece ser maior nos cães portadores de melanomas orais em estágio I, do que em estágios mais avançados (TUOHY et al., 2014).

Manley et al. (2011) adaptaram esse sistema de estadiamento para cães com melanomas digitais e, também relataram que a sobrevida média dos cães em estágios mais avançados é menor do que em estágios iniciais (952 dias e 1.093 para os cães em estágios I e II, e 321 e 76 dias para os cães nos estágios III e IV, respectivamente).

Em cães portadores de melanomas orais, já está bem estabelecida a influência do tamanho do tumor primário no prognóstico da doença (BERGMAN et al., 2013; SMEDLEY et al. 2014). Boston et al (2014), observaram sobrevida média de 620 dias em cães portadores de melanomas orais menores do que 2cm, enquanto que para os tumores entre 2 e 4cm e maiores do que 4cm, a sobrevida média foi de 240 e 163 dias, respectivamente. Tuohy et al. (2014) relacionaram o aumento de 1cm no tamanho do tumor a um aumento de 32% de recorrência local ou metástases e 29% de morte.

De um modo geral, sugere-se que os tumores maiores estão relacionados a um pior prognóstico, pois apresentam um padrão mais agressivo de comportamento biológico do que os tumores menores. Além disso, este tipo tumoral tem ressecção total dificultada, deixando margens pobres ou comprometidas, além de terem um maior risco de desenvolver metástases distantes, uma vez que estão no local há

mais tempo (BOSTON et al., 2014). Proulx et al. (2003), corroboram com essa afirmativa, pois observaram uma maior porcentagem de diagnósticos de metástases pulmonares nos cães que apresentavam tumores macroscópicos (61%) em relação aos microscópicos (34%).

A presença de metástases influencia no estadiamento da doença, além de ser importante para o estabelecimento do tratamento e do prognóstico. Metástases distantes e/ou em linfonodos regionais estão associadas com piores prognósticos, independente da localização primária do melanoma (SMEDLEY et al., 2014). TUOHY et al. (2014) observaram a presença de metástases no momento do diagnóstico de melanoma oral em menos da metade dos pacientes (10 pacientes com metástase e 59 sem metástase), porém, o tempo de sobrevivência desses pacientes foi muito menor, sendo de 131 dias nos pacientes com metástase e 818 naqueles sem metástase.

A literatura cita ainda a utilização de parâmetros histopatológicos do tumor como ferramentas auxiliares e fundamentais para determinar o prognóstico, como avaliação de margens cirúrgicas, índice mitótico, atipia nuclear, tamanho do núcleo, tipo celular, presença de inflamação e presença de necrose, além de provas imunohistoquímicas, como marcação de Ki67 e proteína S-100 (HAHN et al., 1994 ; SPANGLER & KASS, 2006; BERGMAN et al., 2013; SMEDLEY et al., 2014).

3.3 Modalidades Terapêuticas para o Melanoma Canino

3.3.1 Cirurgia

A cirurgia continua sendo a modalidade terapêutica mais efetiva para melanomas, principalmente para tumores pequenos (< 2cm), móveis e bem circunscritos e em pacientes que não apresentem ainda metástases (BERGMAN et al., 2013). A extensão da ressecção cirúrgica pode variar em função do sítio anatômico, sendo algumas vezes necessárias as amputações de membros e ressecção de grandes porções de tecidos moles e ósseos, o que fica mais evidente em casos de tumores na cavidade oral e nos dígitos (BERGMAN, 2007; BERGMAN et al., 2013). Porém, quando já existem metástases distantes no momento do diagnóstico, os tratamentos cirúrgicos radicais muitas vezes são atenuados e, o

paciente com melanoma é submetido a outros tratamentos, muitas vezes paliativos (BERGMAN, 2007).

Esplin (2008) observou que os pacientes portadores de melanomas na cavidade oral ou nos lábios que vieram a óbito durante o período avaliado, apresentaram tempo médio de sobrevida após o procedimento cirúrgico de quatro meses. No mesmo estudo, 50% dos cães estavam vivos ao fim do período (34 meses) e não haviam apresentado recorrência do tumor (ESPLIN, 2008). Tuohy e colaboradores (2014), demonstraram que os animais que foram submetidos a ressecção cirúrgica do tumor, tiveram tempo de sobrevida médio maior (874 dias) do que aqueles que receberam terapias adjuvantes (396 dias), assim como o intervalo livre de progressão, que foi de 567 dias para os cães tratados somente com cirurgia e de 241 dias para aqueles que receberam outros tratamentos. Porém, sugere-se que a presença de metástases também exerce influência no tempo de sobrevida, e não somente a modalidade terapêutica (TUOHY et al., 2014). Boston et al. (2014), também relataram não haver diferença significativa no tempo médio de sobrevida de cães tratados unicamente com cirurgia em comparação com os que receberam quimioterapia convencional, quimioterapia metronômica ou imunoterapia adjuvantes.

3.3.2 Radioterapia

A radioterapia está indicada nos casos em que o paciente possui um tumor que não pode ser removido cirurgicamente, ou naqueles em que não é possível fazer a remoção completa, deixando as margens cirúrgicas comprometidas e ainda em pacientes que apresentem metástases nos linfonodos regionais, sem metástases distantes (BERGMAN, 2007). Dessa forma, a radioterapia torna-se uma alternativa para o controle local ou regional, e não sistêmico do neoplasma (BERGMAN et al., 2013).

A radioterapia como terapia adjuvante à cirurgia ou à quimioterapia, já demonstrou proporcionar um aumento significativo no tempo médio de sobrevida dos pacientes com melanoma (FREEMAN et al., 2004; BOSTON et al., 2014; KAWABE et al., 2015). Em relação à associação da radioterapia com a quimioterapia, há uma divergência entre os autores. Estudos que compararam a sobrevida média dos pacientes com melanoma oral, tratados somente com radioterapia, com aqueles tratados com radioterapia e quimioterapia, relatam que

não houve aumento significativo no tempo médio de sobrevida, enquanto outros autores obtiveram sobrevida maior nos pacientes que foram tratados somente com radioterapia (PROULX et al., 2003; MURPHY et al., 2005; CUNHA et al., 2013).

Alguns autores afirmam que pacientes tratados com radioterapia como terapia única, apresentam elevadas taxas de recorrência do melanoma e de surgimento de metástases (PROULX et al., 2003; BERGMAN, 2007; CUNHA et al., 2013). Além disso, esse tipo de terapia, conforme o protocolo estabelecido pode causar reações adversas de manifestação aguda, ou então efeitos colaterais cumulativos tardios (PROULX et al., 2003; BERGMAN et al., 2013). São citadas reações locais leves como alopecia e fibrose cutânea, e outras mais severas como necrose óssea e ulcerações e necrose na mucosa oral (BERGMAN et al., 2013).

Contudo, mesmo sendo a radioterapia uma modalidade terapêutica consistente e importante em pacientes humanos, ainda está em fase de avaliação e crescimento na medicina veterinária, tanto no Brasil, como no exterior (CUNHA et al., 2013).

3.3.3 Quimioterapia

O tratamento quimioterápico em pacientes portadores de melanoma está indicado nos casos em que não é possível a ressecção total do tumor e quando são detectadas metástases, podendo ou não ser utilizada em combinação com a radioterapia (MURPHY et al., 2005; DANK et al., 2012; BERGMAN et al., 2013). Porém, não há evidências claras de que a quimioterapia, empregada como terapia única ou como adjuvante a outras modalidades terapêuticas, reduza o risco de metástases ou de recorrência do tumor, assim como também parece não prolongar o tempo médio de sobrevida dos pacientes (BERGMAN et al., 2013).

A literatura aponta que cães portadores de melanomas que receberam tratamento quimioterápico concomitante à radioterapia e, após o procedimento cirúrgico, apresentam sobrevida média variando de 207 até 363 dias, enquanto aqueles que foram tratados com cirurgia e radioterapia, apresentam sobrevida média entre 237 e 307, não havendo diferença significativa no uso da quimioterapia (FREEMAN et al., 2003; PROULX et al., 2003; Murphy et al, 2005). No entanto, deve-se considerar que pacientes em estágios mais avançados, que já apresentem

metástases, têm um prognóstico pior, independente do protocolo terapêutico empregado.

Os principais fármacos utilizados no tratamento do melanoma são cisplatina e carboplatina, que além da baixa eficácia, apresentam inúmeros efeitos colaterais. A administração de cisplatina, principalmente, está associada com nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, mielossupressão, náuseas e vômitos (BARABAS et al., 2008).

3.3.3.1 Quimioterapia Metronômica

A quimioterapia metronômica consiste na administração oral diária de quimioterápicos em baixas doses e de forma contínua, diferindo da quimioterapia convencional, na qual os fármacos são administrados na maior dose tolerada e com intervalos de 7, 14 ou 21 dias entre as aplicações (HANAHAN et al, 2000; BARROS & REPETTI, 2015). Com a quimioterapia metronômica, são mantidos os níveis circulantes de quimioterápicos, mantendo os efeitos citotóxicos, antiangiogênicos e imunomoduladores dos fármacos, e reduzindo os efeitos adversos e a resistência aos quimioterápicos (HANAHAN et al., 2000).

Essa modalidade terapêutica age como uma forma de controle paliativo e está indicada em casos de neoplasia recidivantes, inoperáveis ou metastáticas e em pacientes debilitados, nos quais a quimioterapia convencional não está indicada em decorrência dos efeitos adversos (RODIGHERI & DE NARDI, 2013).

Os protocolos utilizados em quimioterapia metronômica incluem agentes citostáticos, normalmente a ciclofosfamida, frequentemente combinados a fármacos que possuam propriedades anti-angiogênicas, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), podendo ser incluídos também anticorpos monoclonais e inibidores do receptor da tirosina quinase (BARROS & REPETTI, 2015).

Marchetti e colaboradores (2012) utilizaram a quimioterapia metronômica com a administração diária de ciclofosfamida em combinação com celecoxib, em cães que já apresentavam metástases, dentre eles um com melanoma oral em estágio avançado, o qual apresentou remissão completa, com quatro meses de sobrevida livre de doença. Além disso, os autores observaram que todos os animais do estudo apresentaram melhora na qualidade de vida, sem demonstrar sinais toxicidade (MARCHETTI et al., 2012). A associação de ciclofosfamida com piroxicam mostrou-

se eficaz no tratamento adjuvante de cães portadores de melanoma, nos quais a ressecção completa do tumor não foi possível (ELMSLIE et al., 2008).

3.3.4 Eletroquimioterapia ou Eletroporação

A eletroporação consiste na aplicação de séries de pulsos elétricos que favorecem a permeabilidade da membrana e a entrada de moléculas nas células, sendo uma ferramenta útil para aplicação local de agentes quimioterápicos (REED et al., 2010). Com a aplicação da eletroporação após a administração local do quimioterápico (eletroquimioterapia), não há distribuição sistêmica da droga, que vai agir somente no sítio de aplicação, maximizando sua eficácia e reduzindo seus efeitos tóxicos (SPUGNINI et al., 2012). No entanto, sua eficácia no tratamento do melanoma, apesar de promissora, ainda não está bem estabelecida. Estudos apontam que cerca de 50% dos cães portadores de melanomas na mucosa oral tratados com bleomicina através de eletroporação, apresentam redução completa do tumor (SPUGNINI et al., 2012). Já Silveira et al. (2010), utilizaram a eletroquimioterapia para o tratamento de 9 cães diagnosticados com melanoma, sendo sete localizados no saco conjuntival, dois orais e um interdigital. Foi observada remissão total dos tumores em todos os pacientes, necessitando de uma até três sessões em intervalos mensais (SILVEIRA et al., 2010).

Nos casos em que já existem metástases, a eletroquimioterapia age de forma paliativa, já que não há ação sistêmica da droga (REED et al., 2010). Dessa forma, mesmo não exercendo controle sobre as metástases, a eletroquimioterapia pode ser útil nos casos em que os animais apresentam contraindicações para a administração de quimioterápicos sistêmicos ou em tumores inoperáveis (REED et al., 2010; SPUGNINI et al., 2012).

3.3.5 Imunoterapia

A imunoterapia é uma estratégia promissora para o tratamento sistêmico do melanoma canino. Porém, a maioria dessas terapias ainda é cara, utilizam técnicas demoradas e dependentes do estabelecimento do tumor dos pacientes em linhagens celulares, sendo de difícil reprodução, além de necessitarem de estudos mais consistentes antes de serem usadas rotineiramente (BERGMAN, 2007).

Dentre essas estratégias terapêuticas, a mais acessível atualmente é a vacina de DNA xenogênico, criada para ser utilizada como adjuvante no tratamento do melanoma oral canino (BERGMAN, 2007; OTTNOD et al., 2013). Essa vacina já foi aprovada para uso comercial nos EUA, em pacientes portadores de melanomas orais e ainda está em avaliação na Europa, não estando ainda disponível para a venda no Brasil (MARTIN & ARGYLE, 2013). Em suma, o mecanismo de ação da vacina baseia-se no estímulo para a formação de anticorpos contra a tirosinase tumoral, que é essencial para a síntese de melanina (BERGMAN, 2007). Porém, de acordo com LIAO et al. (2010), a resposta humoral esperada, só é atingida de 3 a 9 meses depois da aplicação da última dose da vacina (4ª dose) e, dessa forma, os pacientes em estágios mais avançados, viriam a óbito antes de terem uma resposta ideal (GROSENBAUGH et al., 2011).

A literatura aponta a vacina comercial como uma estratégia segura, com poucos efeitos colaterais, que normalmente se limitam a hematomas, eritema e dor local após a aplicação (GROSENBAUGH et al., 2011). Por outro lado, a eficácia da vacina como terapia adjuvante ainda é discutida entre os autores, principalmente no que diz respeito ao aumento da sobrevida dos pacientes (BERGMAN, 2007; OTTNOD et al., 2013; GROSENBAUGH et al., 2011, MARTI & ARGYLE, 2013).

3.4 Plantas Medicinais e Câncer

Há milhares de anos, as plantas utilizadas como alimentos e condimentos, também desempenham um importante papel na medicina popular, geralmente aplicadas em preparações rústicas como tinturas, chás, pós e pomadas (AL-KALALDEH et al., 2010).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde estima que 65-80% da população pertencente aos países em desenvolvimento, dependem das plantas medicinais, sendo essa a sua única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (MATOS, 2014). Considerando apenas a população brasileira, somente 20% das pessoas tem acesso a 63% dos medicamentos disponíveis, enquanto o restante tem os medicamentos de origem natural como seu único recurso terapêutico, principalmente as plantas medicinais (DI STASI, 1996). Em consequência disso, somado ao declínio da eficácia dos fármacos disponíveis, nas últimas décadas, os produtos vegetais vêm chamando a atenção dos pesquisadores devido ao seu

potencial antimicrobiano, antioxidante e anticancerígeno (BAKKALI et al., 2008). Nesse contexto, as pesquisas envolvendo plantas medicinais e o isolamento de seus compostos ativos, resultaram no desenvolvimento de fármacos destinados para diversas finalidades, como analgésicos, quimioterápicos antineoplásicos e antibióticos, correspondendo a cerca de 50% de todos os medicamentos aprovados mundialmente para uso na atualidade (AL-KALALDEH et al., 2010; MARRELI et al., 2015). Quando considerados somente os fármacos usados para o tratamento do câncer, essa porcentagem chega a 60% (SOLOWEY et al., 2014).

Em humanos estima-se que 60% dos pacientes oncológicos utilizam algum tipo de terapia alternativa ao longo do curso da doença, além das modalidades convencionais (ARAÚJO et al., 2007). Na Ásia, aproximadamente 50% dos pacientes com câncer utilizam produtos derivados de plantas durante o tratamento (SOLOWEY et al., 2014).

Na medicina popular, as plantas também são utilizadas para o tratamento do câncer nos animais (MARINHO et al., 2007). No entanto, ainda são escassos os estudos comprovando a atividade antineoplásica das plantas medicinais em animais. Os estudos utilizando células tumorais animais e modelos experimentais, tem como objetivo o desenvolvimento de terapias para aplicação em medicina humana. Porém, devido às semelhanças fisiológicas entre cães e humanos, e entre suas afecções neoplásicas, muitos desses estudos podem ser extrapolados para a medicina veterinária (SCHIFFMAN & BREEN, 2015).

Os processos vegetais vitais de biossíntese são responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de substâncias no interior das células que formam os diversos tecidos dos organismos vegetais (MATOS et al., 1997). O metabolismo primário fornece à planta as substâncias necessárias para as suas funções básicas, como a respiração e a síntese de substâncias essenciais para a manutenção das funções celulares (BRAZ FILHO, 2010). Já os metabólitos secundários são específicos de cada espécie de planta e contribuem para a sua sobrevivência ambiental, protegendo-as de doenças e parasitas, além de contribuir com a formação dos diferentes aromas e cores (BRAZ FILHO, 2010). Os terpenóides, alcalóides, glicosídeos, flavonóides, fenilpropanóides, dentre outros, são produtos do metabolismo vegetal secundário e estão associados às propriedades terapêuticas das plantas medicinais, podendo ser utilizadas na forma natural ou por extratos

(ADORJAN & BUCHBAUER, 2010; SIMÕES & ALMEIDA, 2015; BAILÃO et al., 2015).

Dentre as inúmeras famílias botânicas estudadas, as famílias Lamiaceae, Fabaceae, Anacardiaceae e Myrtaceae destacam-se pelo seu uso popular, pela ampla distribuição e facilidade de aquisição e, pela composição química rica em substâncias bioativas, apresentando assim, grandes potencialidades para pesquisas científicas (GIORDANI, 2013; GUTERRES, 2015; VICTORIA et al., 2012; SANTIN, 2014; MATOS, 2014).

3.4.1 Família Lamiaceae

A família Lamiaceae é composta por cerca de 250 gêneros e 6.970 espécies, sendo primeiramente difundidas pela região do Mediterrâneo e, posteriormente introduzidas em outros países (PORTE & GODOY, 2001; PEREIRA et al., 2012). No Brasil, são encontradas aproximadamente 26 gêneros e 350 espécies (SILVA et al., 2011)

Dentro dessa família, destacam-se as plantas *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum majorana* (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas, atuando como bactericidas, antioxidantes, fungicidas, antitumorais, dentre outras, tanto na forma de óleos essenciais, como na forma de extratos (HAIDA et al., 2007; HUSSAIN et al., 2011; SILVA et al., 2011; SANTIN, 2014; MATOS, 2014;).

O *Origanum vulgare* é uma planta aromática amplamente utilizada na culinária e na medicina popular (CLEFF, 2008; ROMERO et al., 2012; MATOS, 2014). Suas diferentes formas de extração geram produtos vegetais, como extratos e óleos essenciais, que apresentam propriedades antimicrobiana, antioxidante e anticancerígena, entre outras que já foram cientificamente comprovadas (CLEFF, 2008; HUSSAIN et al., 2011; MATOS, 2014; SANTIN et al., 2014; VASKO et al., 2014; GUTERRES, 2015).

Atualmente, a atividade citotóxica e antioxidante do *O. vulgare* vem sendo foco de diversas pesquisas que sugerem que essa planta pode desempenhar um importante papel na prevenção e controle do câncer (SAVINI et al., 2009; BERRINGTON & LALL, 2012, KOLDAS et al., 2013). A ação antioxidante do *O.*

vulgare está relacionada à presença de compostos fitoquímicos como polifenóis e flavonoides, uma vez que os mesmos combatem danos celulares oxidativos e, conseqüentemente, algumas mutações que podem levar ao câncer (KOLDAS et al., 2014; MARRELLI et al., 2015).

O extrato hidroalcolóico de orégano já se mostrou efetivo em controlar a proliferação *in vitro* de células de carcinoma hepático (HepG2) (MARRELLI et al., 2015), enquanto o extrato metanólico, demonstrou atividade citotóxica em células de carcinoma colorretal (HCT-116) e de adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231) (GRBOVIC et al., 2013).

Os extratos etanólico, aquoso e metanólico de *O. vulgare*, demonstraram atividade inibitória em células de carcinoma cervical (HeLa), sendo que todos extratos apresentaram atividade antiproliferativa similar na maior concentração testada (KOLDAS et al., 2014).

O óleo essencial de *O. vulgare* apresentou atividade inibitória para o crescimento de linhagens de leucemia linfoblástica (CEM), carcinoma mamário (MDA), carcinoma alveolar (A-549) e adenocarcinoma colorretal (CaCo2) (VASKO et al., 2014). Entretanto, Berrington & Lall (2012), ao utilizarem a linhagem celular HeLa e células da linhagem Vero (rim de macaco verde africano), para verificar a atividade citotóxica do óleo essencial de orégano frente a células de câncer e normais, observaram ser necessária uma concentração mais alta do óleo para inibir a proliferação das células Vero, quando comparadas as células de carcinoma. Corroborando com Berrington & Lall (2012), Hussain et al. (2011) demonstraram que a concentração citotóxica do óleo essencial de orégano foi menor para células de carcinoma prostático (LNCaP) e de carcinoma mamário (MCF-7), do que para a linhagem de fibroblastos normais.

Origanum majorana é uma planta aromática perene que contém grandes quantidades de compostos antioxidantes como flavonoides (diosmetina, luteolina e apigenina) e terpenoides (timol e carvacrol) (ABDEL-MASSIH et al., 2010). Essas substâncias bioativas podem prevenir doenças causadas pelo estresse oxidativo, como por exemplo, o câncer (ABDEL-MASSIH et al., 2010; ELANSARY & MAHMOUD, 2014).

Com relação a atividade antineoplásica, Rao et al. (2014) demonstraram que o extrato etanólico de *O. majorana* exerceu uma significativa atividade antiproliferativa frente a linhagem celular de fibrossarcoma, e uma baixa toxicidade

em linfócitos humanos normais, na mesma concentração. Abdel-Massih et al. (2010), também demonstraram atividade inibitória do extrato de manjerona em células humanas de leucemia, com baixa toxicidade em linfócitos. A atividade antiproliferativa do extrato de *O. majorana* também já foi demonstrada em linhagens de carcinoma epitelial cervical (HeLa), carcinoma mamário (MCF-7) e leucemia (Jurkat cell) Elansary & Mahmoud, 2014). Hussain et al. (2011) testaram a atividade do óleo essencial de *O. majorana* em cultivos celulares de carcinoma mamário, carcinoma prostático e em fibroblastos e, observaram que as concentrações que foram efetivas frente às linhagens de carcinomas não foram tóxicas para os fibroblastos.

Dentre as plantas da família Lamiaceae, *Rosmarinus officinalis* talvez seja o mais antigo em relação à aplicação medicinal, sendo utilizado desde a antiguidade para prevenção e tratamento de diversas doenças (CATTANEO et al., 2015). No antigo Egito, na época dos faraós, essa erva já era popularmente usada para a prevenção do câncer em humanos (ELANSARY & MAHMOUD, 2014).

Atualmente, amplas pesquisas vêm demonstrando o potencial antiproliferativo do alecrim frente a diversas linhagens de células neoplásicas (YESIL-CELIK TAS et al., 2010; MOTHANA et al., 2011; TAI et al., 2012; ELANSARY & MAHMOUD, 2014; CATTANEO et al., 2015; MARRELLI et al., 2015). Essas propriedades terapêuticas associadas ao *R. officinalis* são atribuídas aos seus constituintes polifenólicos, como o carnosol, ácido carnósico, rosmanol, ácido rosmarínico e ácido ursólico (YESIL-CELIK TAS et al., 2010; CHUN et al., 2014).

A citotoxicidade do extrato hidroalcolólico de *R. officinalis* já foi demonstrada perante a linhagens celulares de melanoma (A375), carcinoma colorretal (LoVo), carcinoma hepático (HepG2), carcinoma cervical (HeLa), carcinoma mamário (MCF-7) e leucemia (Jurkat cell) (ELANSARY & MAHMOUD, 2014; CATTANEO et al., 2015; MARRELLI et al., 2015). Além disso, Tai et al. (2012), demonstraram que a associação do extrato hidroalcolólico de alecrim com cisplatina, exerceu maior atividade antiproliferativa em linhagens de carcinoma ovariano (A2780 e A2780CP70) do que quando utilizados isoladamente, sendo esta planta um promissor candidato também como adjuvante em protocolos terapêuticos antineoplásicos.

Hussain et al. (2010), avaliaram ainda a atividade antiproliferativa do óleo essencial de *R. officinalis* em linhagem celulares de carcinoma mamário (MCF-7),

carcinoma prostático (LNCap) e em fibroblastos (NIH-3T3). Nesse estudo, foram necessárias concentrações mais elevadas do óleo essencial para inibir a proliferação dos fibroblastos do que das linhagens celulares neoplásicas, demonstrando uma baixa toxicidade desse produto *in vitro* (HUSSAIN et al., 2010). Já em um estudo utilizando o extrato aquoso de *R. officinalis*, Mothana et al. (2011) observaram que a concentração necessária para inibir a proliferação das células de carcinoma mamário foi a mesma que inibiu a proliferação de células epiteliais normais.

Diante desses resultados, observa-se a necessidade de realizar novos estudos, a fim de estabelecer a toxicidade *in vitro* e *in vivo*, dos diversos produtos vegetais que podem ser obtidos destas plantas.

3.4.2 Família Fabaceae

A família Fabaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com 727 gêneros e aproximadamente 19.000 espécies e está distribuída em países tropicais da África, Ásia e América do Sul (FILHO, 2009; SILVEIRA & MIOTTO, 2013).

Entre as diversas espécies de importância medicinal, pertencentes a essa família, destacam-se as do gênero *Bauhinia*, que compreende cerca de 300 espécies, das quais 200 são brasileiras (VAZ & TOZZI, 2005).

Bauhinia forficata, está bem distribuída no Sul do Brasil, sendo conhecida vulgarmente como “pata-de-vaca”, foi primeiramente utilizada como hipoglicemiante através da medicina popular (FERRERES et al., 2012). Atualmente, a ação dos extratos de *B. forficata* no controle da glicemia já foi comprovada cientificamente, assim como seu potencial antibacteriano, antifúngico e antioxidante (SILVA & FILHO, 2002; INDIANARA et al., 2008; FILHO, 2009; FERRERES et al., 2012; MICELI et al., 2015).

As atividades biológicas atribuídas a *Bauhinia forficata*, estão associadas aos seus compostos bioativos como terpenos, esteroides, ácidos aromáticos, quinonas, lactonas, alcaloides e, principalmente, flavonoides (FILHO, 2009; MICELI et al., 2015). As atividades biológicas que podem ser exercidas pelos compostos fitoquímicos, têm despertado interesse no âmbito da pesquisa científica, principalmente no que tange a proteção celular, toxicidade e efeitos antitumorais

(PRINCIPE & SPIRA, 2009; MICELI et al., 2012; DUSMAN et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Miceli et al. (2012), realizaram um estudo utilizando o extrato hidroalcolico das folhas de *B. forficata*, demonstrando atividades antioxidante, associada a grande quantidade de flavonoides presente no extrato, e citotóxica frente à linhagem celular FO-1, de melanoma humano (MICELI et al., 2012). Os autores avaliaram que o uso do extrato foi seguro em testes *in vivo*, não sendo letal para o modelo experimental *Artemia salina*, mesmo em concentrações elevadas, além de não apresentar toxicidade *in vitro* para linfócitos humanos (MICELI et al., 2012).

Principe & Spira (2009), demonstraram que o extrato metanólico de *B. forficata* não teve efeito citotóxico em células de leucemia humana (Jurkat cells), mesmo em concentrações elevadas. Porém, foi capaz de inibir a expressão do conjunto de enzimas glutathione S-transferase (GST) na mesma linhagem celular. A importância desse resultado está no fato de que os extratos com atividade anti-GST, podem reduzir os níveis de expressão dessas enzimas e, conseqüentemente, reduzir também a resistência a quimioterápicos em células neoplásicas (PRINCIPE & SPIRA, 2009).

Dusman et al. (2013), comprovaram o efeito celular protetivo e a baixa citotoxicidade do extrato aquoso de *B. forficata* em ratos Wistar tratados com ciclofosfamida pela via intraperitoneal, através da avaliação histopatológica da medula óssea dos animais. Os autores concluíram que a atividade antioxidante desse extrato está associada a sua baixa toxicidade celular, além de contribuir na redução de possíveis danos celulares induzidos por agentes quimioterápicos, como a ciclofosfamida (DUSMAN et al., 2013).

Devido à presença da proteína lectina, as plantas do gênero *Bauhinia* apresentam importante atividade aglutinante sobre vários tipos de células e, dessa forma, seriam capazes de inibir a adesão de células tumorais e, conseqüentemente a progressão tumoral (SILVA et al., 2014; LOPEZ & SANTOS, 2015). A atividade da lectina presente nas sementes de *B. forficata*, foi demonstrada frente à linhagem celular de carcinoma mamário (MCF-7), sendo que a proliferação das células do carcinoma foi inibida pela lectina, através da inibição da adesão das mesmas, o que provocou a morte celular (SILVA et al., 2014).

3.4.3 Família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae possui mais de 70 gêneros e cerca de 600 espécies (CARVALHO, 2013). Fazem parte dessa família, as plantas do gênero *Schinus*, originário da América do Sul, nativo do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina. Esse gênero possui aproximadamente 29 espécies, dentre elas o *Schinus terebinthifolius* (BENDAOUUD et al., 2010).

Schinus terebinthifolius, é utilizado na medicina popular para o tratamento de distúrbios digestivos, problemas respiratórios, doenças geniturinárias, além de ser considerado depurativo, antitérmico e analgésico (GIORDANI, 2013; CARVALHO et al., 2013). Cientificamente, já foram comprovadas suas atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e também antitumoral, em diversas preparações de extratos e de óleos essenciais, além do uso dos compostos isolados de extratos (QUEIRES et al., 2006; BENDAOUUD et al., 2010; MAHMOUD et al., 2011; MATSUO et al., 2011; ESTEVÃO et al., 2015).

Mahmoud et al. (2011) testaram a atividade inibitória de diferentes extratos das folhas da aroeira-mansa em linhagens celulares de melanoma humano (MDA-MB-435), carcinoma colorretal humano (HCT-8) e glioblastoma (SF-295). Todos os extratos demonstraram atividade antiproliferativa em todas as linhagens, sendo o extrato hidroalcolico mais efetivo frente à linhagem de carcinoma colorretal, seguida pelas células de melanoma e a menor efetividade ocorreu nas células de glioblastoma (MAHMOUD et al., 2011). Em outro estudo, conduzido por Bendaoud et al. (2010), foi demonstrado que o óleo essencial obtido a partir dos frutos de *Schinus terebinthifolius*, foi capaz de exercer atividade antiproliferativa *in vitro* em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7).

Alguns compostos bioativos como terpenos e flavonoides, presentes em todas as partes do *S. terebinthifolius*, estão associados com as suas propriedades antioxidantes, antiproliferativas e antitumorais (QUEIRES et al., 2006; MATSUO et al., 2011). Nesse contexto, estão sendo desenvolvidas pesquisas a fim de identificar, isolar e testar suas possíveis aplicações. Matsuo et al. (2011), isolaram o composto orgânico alfa-pineno, do óleo essencial dos frutos da aroeira-mansa, e testaram sua aplicação terapêutica em modelos experimentais de melanoma metastático. Os autores observaram uma significativa redução na formação de nódulos metastáticos

pulmonares nos ratos que receberam o alfa-pineno, em comparação com aqueles que não receberam (MATSUO et al. , 2011).

Algumas frações de polifenóis presentes no extrato de *S. terebinthifolius* foram isoladas por Queires e colaboradores (2006), que testaram sua atividade inibitória em células de carcinoma prostático, demonstrando atividade inibitória superior de uma das frações fenólicas, quando comparadas ao extrato aquoso e outras frações.

O extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* foi testado *in vitro* e *in vivo*, quanto a sua toxicidade cutânea, em amostras de epiderme reconstituída e em voluntários. Neste estudo, não foi observada citotoxicidade nas amostras testadas, bem como não foram relatadas alterações cutâneas irritativas no teste *in vivo* (JORGE et al., 2012).

3.4.4 Família Myrtaceae

As plantas da família Myrtaceae estão distribuídas mundialmente e compreendem mais de 100 gêneros e cerca de 3.600 espécies. O gênero *Eugenia* possui 14 espécies subtropicais, presentes no norte e nordeste da Argentina, no Uruguai, Paraguai e no Brasil (BAGETI, 2009).

A planta *Eugenia uniflora* (pitangueira), pertencente à família Myrtaceae, é bem distribuída nos países da América do Sul (BAGETI, 2009). Os frutos e folhas dessa planta são popularmente utilizados para desordens gastrointestinais, como dores estomacais e diarreia, e no tratamento de parasitoses intestinais (GIORDANI, 2013). *E. uniflora* demonstra potencial antioxidante, antimicrobiano, anti-chagásico e anti-inflamatório, assim como baixa toxicidade *in vitro* e *in vivo* na forma de extrato aquoso (SHAPOVAL et al., 1994; ; MONKS et al., 2002; SANTOS et al., 2012; VICTORIA et al., 2012).

Diferentes produtos vegetais obtidos do caule, das folhas e dos frutos da *E. uniflora*, já tiveram sua atividade antitumoral comprovada *in vitro*. O extrato aquoso das folhas da pitangueira demonstrou atividade inibitória potente em células humanas de carcinoma colorretal (HT29) e carcinoma pulmonar (H460) (MONKS et al., 2002). Mahmoud et al. (2011) testaram o potencial antiproliferativo do extrato da casca do caule de *E. uniflora* em linhagens celulares de melanoma (MDA-MB-435), carcinoma colorretal (HCT-8) e glioblastoma, nas quais o extrato demonstrou alta

atividade inibitória, principalmente nas células de melanoma. Supriyati e colaboradores (2011) observaram forte atividade antiproliferativa dose-dependente do extrato metanólico de *E. uniflora*, em um estudo *in vitro* com adenocarcinoma mamário (MCF-7).

Os óleos essenciais obtidos das folhas e dos frutos de *E. uniflora* demonstraram excelente atividade antiproliferativa em células de carcinoma hepatocelular (Hep G2), carcinoma ductal mamário (Hs 578T) e carcinoma prostático (PC-3) (OGUNWANDE et al., 2005). Victoria e colaboradores (2012), comprovaram o potencial antioxidante do óleo essencial das folhas de pitangueira. O óleo ainda demonstrou baixa toxicidade aguda *in vivo*, quando administrado pela via oral em modelos experimentais (VICTORIA et al., 2012).

Diante dos estudos avaliados, observa-se um grande potencial na pesquisa com uso de extratos vegetais das famílias Lamiaceae, Fabaceae, Anacardiaceae e Myrtaceae, uma vez que podem representar alternativas aos tratamentos que já vem sendo utilizados nos protocolos antineoplásicos.

3.5 Avaliação da Toxicidade dos Produtos Vegetais

No Brasil, as plantas medicinais que tenham sua eficácia comprovada cientificamente em determinadas enfermidades, tem seu uso regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2011). Porém, mesmo com os avanços em estudos e pesquisas realizados nessa área, várias espécies de plantas ainda são utilizadas segundo as orientações da medicina popular (GIORDANI, 2013).

Essa realidade é preocupante, pois o uso empírico é insuficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros, uma vez que não são conhecidas as causas específicas de todas as possíveis reações adversas ligadas ao uso das plantas (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006; AGRA et al., 2007; 2008).

A partir disso, a determinação do potencial tóxico dos extratos de plantas torna-se de grande importância, tendo em vista a aplicabilidade dos resultados, pois a toxicidade é um dos principais fatores limitantes para que um extrato vegetal possa ser indicado como medicinal (BLANK, 2013).

Dessa forma, faz-se necessária a realização de testes de eficácia e de segurança das plantas medicinais, utilizando métodos específicos que sejam aceitos pela legislação (BRASIL, 2004). Com o intuito de minimizar o uso de animais nos testes de toxicidade, podem ser utilizadas novas alternativas no âmbito da pesquisa, como o uso de organismos menores e menos desenvolvidos e os testes em cultivos de células (BONES & MOLETO, 2011).

3.5.1 Testes de Toxicidade *in vitro* – Uso do Cultivo Celular

Nesse tipo de teste, são utilizadas culturas de células para a avaliação dos danos causados pela substância em nível celular (BEDNARCZUK et al., 2010). Trata-se de um método aplicado em pesquisas básicas preliminares, que permite a observação das alterações celulares provocadas pela substância teste do ponto de vista microscópico, molecular e químico (MORALES, 2008). As principais vantagens do uso de cultivos celulares em testes de toxicidade são a reprodutibilidade, a sensibilidade e a rapidez (BEDNARCZUK et al., 2010).

A observação da viabilidade celular após a exposição ao produto testado pode ser mensurada por diferentes metodologias, sendo a técnica colorimétrica utilizando MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) uma das mais frequentemente utilizadas. Essa técnica consiste em um ensaio quantitativo, que determina a interrupção de uma função bioquímica celular crítica, que é a atividade mitocondrial. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT a formazan, o que leva a alteração de coloração e solubilidade do sal, pela atividade das desidrogenases mitocondriais. Sendo assim, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade das mitocôndrias e à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Porém, os testes de citotoxicidade podem superestimar a toxicidade de uma substância *in vivo*, uma vez que as estruturas teciduais e os processos de biotransformação e de transporte não podem ser simulados em cultura de células (REICHLING et al., 2009). Dessa forma, os testes de toxicidade celular *in vitro* podem auxiliar na redução do número de animais utilizados nas pesquisas científicas, porém, não podem substituir por completo os testes *in vivo* (MORALES, 2008).

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Atividade citotóxica de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae em células de melanoma

SILVA, Cristine Cioato*; GIORDANI, Claudia; FREITAG, Rogerio; PICOLI, Tony; FISCHER, Geferson; CLEFF, Marlete Brum

Será submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

1 **Atividade citotóxica de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae em**
2 **células de melanoma**

3
4 **Cytotoxic activity of essential oils from plants of the family Lamiaceae in**
5 **melanoma cells**

6
7 SILVA, Cristine Cioato*; GIORDANI, Claudia; FREITAG, Rogerio; PICOLI,
8 Tony; FISCHER, Geferson; CLEFF, Marlete Brum

9
10 Universidade Federal de Pelotas

11
12 *Autor para correspondência: Campus Universitário, s/n° - CEP: 96160-000,
13 Capão do Leão, RS/BR
14 E-mail: criscioato@hotmail.com

15
16 **RESUMO**

17 O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade citotóxica dos óleos essenciais de *O.*
18 *vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* em linhagens celulares de melanoma murino
19 (B16F10) e de rim bovino (MDBK), e determinar a composição química dos extratos.
20 Os óleos essenciais foram extraídos das folhas secas das espécies vegetais, diluídos e
21 distribuídos em placas de 96 poços, sob as monocamadas de células das linhagens
22 B16F10 e MDBK, que foram incubadas por 24 horas, em 37°C com atmosfera úmida e
23 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT e a leitura feita em
24 espectrofotômetro (540nm). Todos os óleos avaliados foram efetivos em inibir as
25 células de melanoma, porém não houve diferença significativa entre eles e entre suas
26 concentrações, assim como em relação a citotoxicidade na linhagem MDBK. As
27 concentrações efetivas e não tóxicas dos óleos essenciais de *O. majorana* e *O. vulgare*
28 foram 490 e 245 µg.mL⁻¹. O óleo de *R. officinalis*, apresentou elevada toxicidade nas
29 concentrações efetivas nas células B16F10. Os compostos majoritários identificados
30 foram 1-8 cineol, canfor e α-pinene, no óleo essencial de *R. officinalis*; 4-terpineol, 4-
31 carene e 5-isopropyl-2-methylbicyclo no óleo essencial de *O. majorana* e γ-terpineno,
32 4-terpineol e hidroxy-p-cymene no óleo essencial de *O. vulgare*. Com os resultados
33 evidenciados nesse estudo, conclui-se que os óleos essenciais de *O. majorana* e de *O.*
34 *vulgare* apresentaram alta citotoxicidade *in vitro* em células de melanoma e representam
35 promissoras fontes de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos

1 antineoplásicos. O óleo essencial *R. Officinalis* também mostrou-se efetivo, porém com
2 baixa citotoxicidade na linhagem de melanoma murino.

3 Palavras-chave: Melanoma; Citotoxicidade; *Origanum vulgare*; *Origanum majorana*;
4 *Rosmarinus officinalis*.

6 ABSTRACT

7 The objective was to assess the cytotoxic activity of essential oils of *O. vulgare*, *O.*
8 *majorana* and *R. officinalis* in cell lines of murine melanoma (B16F10) and bovine
9 kidney (MDBK), and determine the chemical composition of the extracts. The essential
10 oils were extracted from the dried leaves of the plant species, diluted and distributed in
11 96-well plates in cell monolayers of B16F10 and MDBK lines which were incubated for
12 24 hours at 37 °C in humid atmosphere, 5% CO₂. Cell viability was assessed by MTT
13 assay and the reading taken in a spectrophotometer (540 nm). All evaluated oils were
14 effective in inhibiting melanoma cells, but there was no significant difference between
15 them and between their concentrations, as well as in relation to cytotoxicity in MDBK
16 line. Effective and non-toxic concentrations of the essential oils of *O. majorana* and *O.*
17 *vulgare* were 490 and 245 µg.mL⁻¹. The *R. officinalis* oil, showed high toxicity at
18 effective concentrations in B16F10 cells. The major identified compounds were 1-8
19 cineol, camphor and α-pinene in the essential oil of *R. officinalis*; 4-terpineol, 4-carene
20 and 5-isopropyl-2-methylbicyclo in the essential oil of *O. majorana* and γ-terpinene, 4-
21 terpineol and Hydroxy-p-cymene in the essential oil of *O. vulgare*. With the results
22 shown in this study, it is concluded that the essential oils of *O. majorana* and *O. vulgare*
23 showed high cytotoxicity in vitro melanoma cells and represent promising sources to
24 study the development of new anticancer drugs. The essential oil *R. officinalis* also was
25 effective, but with low cytotoxicity in murine melanoma line.

26 Keywords: Melanoma; Cytotoxicity; *Origanum vulgare*; *Origanum majorana*;
27 *Rosmarinus officinalis*.

29 Introdução

31 O melanoma é uma neoplasia mucocutânea originada de células melanocíticas
32 que acomete diversas espécies, sendo comum em cães e em humanos, os quais

1 compartilham semelhanças, principalmente no que se refere ao comportamento
2 biológico e à resistência farmacológica do tumor (Bergman *et al.*, 2013; Schiffman e
3 Breen, 2015). Apesar de ter uma frequência entre três e 20%, o melanoma tem grande
4 importância na oncologia veterinária por tratar-se de um tumor invasivo, altamente
5 metastático e pouco responsivo ao tratamento quimioterápico convencional,
6 especialmente nos estágios mais avançados (Rolim *et al.*, 2012; Bergman *et al.*, 2013).

7 A crescente resistência desenvolvida pelas células cancerígenas aos fármacos
8 quimioterápicos, observada em pacientes com melanoma e outras neoplasias, somada
9 aos severos efeitos colaterais desses medicamentos, alavancaram as pesquisas
10 científicas com produtos naturais, na busca de novos agentes para o tratamento do
11 câncer (Russo *et al.* 2016). Nesse contexto, as pesquisas envolvendo plantas medicinais
12 e o isolamento de seus compostos ativos, resultaram no desenvolvimento de fármacos
13 destinados para essa finalidade, correspondendo a cerca de 60% de todas as drogas
14 antineoplásicas aprovadas para uso nas últimas décadas (Solowey *et al.*, 2014).

15 Em humanos estima-se que 60% dos pacientes oncológicos utilizam algum tipo
16 de terapia alternativa ao longo do curso da doença, associado as modalidades
17 convencionais (Araújo *et al.*, 2007). Na Ásia, aproximadamente 50% dos pacientes com
18 câncer, utilizam produtos derivados de plantas durante o tratamento (Solowey *et al.*,
19 2014). Na medicina popular, as plantas também são utilizadas para o tratamento do
20 câncer nos animais, no entanto, ainda são escassos os estudos comprovando a atividade
21 antineoplásica das plantas medicinais em animais (Marinho *et al.*, 2007).

22 As plantas da família Lamiaceae destacam-se nesse contexto, por serem ricas em
23 substâncias bioativas. Os extratos e óleos essenciais obtidos de *Rosmarinus officinalis*,
24 *Origanum marjorana* e *Origanum vulgare*, todas pertencentes à família Lamiaceae, já
25 demonstraram ação antiproliferativa frente a diversas linhagens humanas de células
26 tumorais (Hussain *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2014; Begnini *et al.*, 2014).

27 Frente ao exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade citotóxica dos
28 óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* frente a linhagem celular de
29 melanoma murino (B16F10) e de rim bovino (MDBK), além de determinar a
30 composição química dos extratos.

31

32

1 Material e métodos

2

3 As folhas secas de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* foram adquiridas de
4 distribuidor comercial (Lote n°: 00814) com laudo de certificação botânica e, a extração
5 dos óleos foi realizada de acordo com as orientações da Farmacopéia Brasileira IV
6 (1988). O material vegetal foi submetido à extração com arraste de vapor, em aparelho
7 Clevenger, durante 4 horas. Após a extração, o óleo obtido foi seco com sulfato de
8 sódio anidro, armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração, até a utilização
9 nos testes.

10 Para a identificação dos compostos bioativos dos óleos essenciais, foi utilizado
11 cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GC/MS-QP 2010SE-Shimadzu,
12 Japão), equipado com auto injetor AOC-20i. As quantificações foram feitas por área
13 normatizada e as identificações dos compostos pelo espectrômetro de massas, utilizando
14 a biblioteca NIST 8 do GC/MS.

15 As linhagens celulares B16F10 e MDBK foram cedidas pela Fundação
16 Universidade de Rio Grande e pelo Laboratório de Virologia (LABVIR) – UFPel,
17 respectivamente. Durante o período do experimento, as células foram mantidas em
18 MEM (meio essencial mínimo), acrescido de antibiótico, antifúngico e soro fetal bovino
19 em uma concentração de 10%, e armazenadas em estufa a 37°C com atmosfera úmida
20 com 5% de CO₂. Para os testes, as células foram semeadas em placas de 96 poços, onde
21 foram adicionados os óleos (OEOV – óleo essencial de *O. vulgare*, OERO – óleo
22 essencial de *R. officinalis*, OEOM – óleo essencial de *O. majorana*) em triplicata, nas
23 seguintes concentrações (µg.mL⁻¹): 62500, 31250, 15600, 7800, 3900, 1950, 975, 490 e
24 245.

25 Para emulsificação dos óleos com o meio de cultura foi utilizado o
26 dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 0,1%. O DMSO não apresentou
27 toxicidade na concentração de 0,1% para as células utilizadas nesse estudo, em testes
28 realizados previamente. Após 24 horas de incubação a 37°C com 5% de CO₂, a
29 viabilidade celular foi avaliada utilizando o MTT, com posterior leitura em
30 espectrofotômetro (540 nm) (Mosmann, 1983). As concentrações dos óleos foram
31 classificadas de acordo com Mahmoud *et al.* (2011), levando em consideração o
32 potencial inibitório e tóxico, sendo considerada atividade/citotoxicidade alta, quando a

33

1 viabilidade celular estiver entre 1 e 50%; atividade/toxicidade moderada se a viabilidade
 2 celular ficar entre 51 e 75% e baixa atividade/toxicidade, quando a viabilidade celular
 3 estiver entre 76 e 100%.

4 A análise estatística dos dados foi realizada com o programa Statistix 9.0, pela
 5 metodologia da análise de variância (ANOVA), comparando as médias de viabilidade
 6 celular pelo teste de Tukey em relação aos diferentes óleos e às concentrações
 7 utilizadas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

8 Resultados e discussão

10 A atividade antiproliferativa dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e
 11 *R. officinalis* frente às linhagens celulares B16F0 e MDBK estão demonstradas na
 12 tabela 1.

13 Tabela 1. Concentrações de óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R.*
 14 *officinalis* que demonstraram atividade antiproliferativa na linhagem B16F10 e baixa
 15 toxicidade em células MDBK .
 16

	Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	B16F10 (% células viáveis)	MDBK (% células viáveis)
OEOV	490	31,1	68,1
	245	30,2	72
OERO	490	56,3	72,5
	245	69,3	68
OEOM	975	25,8	77,4
	490	22,1	84
	245	30,1	80,7

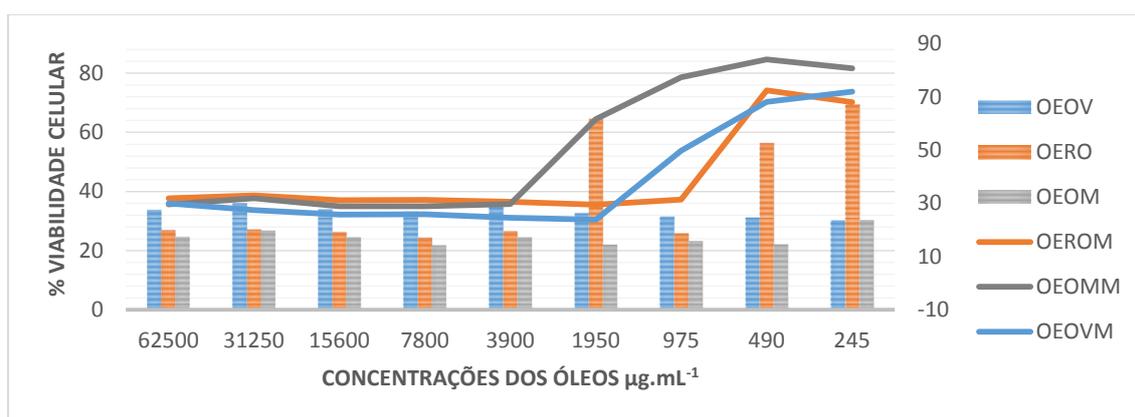
17 OEOV: óleo essencial de *Origanum vulgare*; OERO: óleo essencial de
 18 *Rosmarinus officinalis*; OEOM: óleo essencial de *Origanum majorana*.

19 Todos os óleos essenciais foram efetivos em inibir a proliferação das células de
 20 melanoma murino (B16F10) em todas as concentrações testadas, não havendo diferença
 21 significativa entre eles ($p > 0,05$). Porém, as concentrações com baixa toxicidade do óleo
 22 essencial de *R. officinalis*, 490 e $245 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentaram atividade citotóxica menor
 23

1 em relação aos demais óleos, com viabilidade celular de 56,3 e 69,3%, respectivamente,
2 na linhagem de melanoma.

3 Apesar de todos os óleos terem exibido atividade inibitória na linhagem de
4 melanoma, os óleos de orégano e manjerona foram considerados mais efetivos, pois
5 demonstraram altas porcentagens de inibição, nas mesmas concentrações em que o
6 alecrim apresentou atividade moderada, além de apresentarem moderada e baixa
7 toxicidade, respectivamente em células renais. O OEOM destacou-se ainda por
8 apresentar três concentrações consideradas de alta atividade inibitória e de baixa
9 toxicidade, enquanto o OEOV apresentou duas concentrações com alta atividade e
10 moderada toxicidade e o OERO, apresentou duas concentrações com atividade e
11 toxicidade moderadas.

12 As demais concentrações dos óleos *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*
13 testadas, apesar de demonstrarem alta atividade inibitória nas células de melanoma,
14 foram também altamente tóxicas para as células renais (Figura 1).



15
16 Figura 1. Gráfico demonstrando a viabilidade das células das linhagens testadas, onde
17 as colunas representam a atividade dos óleos essenciais em células B16F10 e as linhas,
18 em células MDBK. *OEOV: óleo essencial de *Origanum vulgare*; OERO: óleo
19 essencial de *Rosmarinus officinalis*; OEOM: óleo essencial de *Origanum majorana*.

20

21 Na análise cromatográfica, 39 compostos químicos foram identificados, dos
22 quais nove foram referentes ao óleo essencial de *R. officinalis*, sendo os compostos
23 majoritários 1-8 cineol, canfor e α -pinene. Outros 15 compostos, referem-se ao óleo
24 essencial de *O. majorana*, com 4-terpineol, 4-carene e 5-isopropyl-2-methylbicyclo
25 como majoritários. Os 15 compostos identificados restantes, foram referentes ao óleo

26

1 essencial de *O. vulgare*, sendo o γ -terpineno, 4-terpineol e hidroxy-p-cymene os
2 majoritários.

3 Os compostos majoritários podem variar entre os óleos essenciais extraídos das
4 mesmas espécies de plantas, em consequência de fatores ambientais e climáticos,
5 ligados ao local de cultivo da planta, do período de colheita, técnica de extração do óleo
6 e de fatores genéticos (Lima e Cardoso, 2007). Devido a essas variações, e a
7 permanência ou ausência de compostos majoritários, observa-se uma ampla variação de
8 atividades biológicas dos óleos essenciais e outros extratos (Lima e Cardoso, 2007;
9 Russo *et al.*, 2015).

10 Com relação a atividade anti-câncer, os óleos essenciais de *Origanum majorana*,
11 *Origanum vulgare* e *R. officinalis* tem demonstrado ação em células humanas de
12 carcinoma mamário (MCF-7), carcinoma prostático (LNCap) e em fibroblastos (NIH-
13 3T3) (Hussain *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2011). O óleo essencial de manjerona,
14 composto por 4-terpienol, linalol, limoneno e α -terpineol, mostrou-se mais efetivo que
15 os demais, exibindo atividade antiproliferativa na concentração de $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na
16 linhagem MCF-7, $85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na célula LNCaP e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas células NIH-3T3.
17 Por sua vez, o óleo de orégano, composto por timol, carvacrol e α -terpineol, demonstrou
18 atividade inibitória intermediária e menor toxicidade, em concentrações de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$
19 na linhagem MCF-7, $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na LNCaP e $320 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na célula NIH-3T3,
20 enquanto o óleo essencial de alecrim, cuja a composição foi 1,8-cineol, canfor, α -
21 pineno, limoneno, canfeno e linalol, apresentou a menor eficácia, com concentrações de
22 $190,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na linhagem MCF-7 e $180,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas células LNCaP e maior
23 toxicidade para os fibroblastos, com concentração de $212 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Hussain *et al.*,
24 2010; Hussain *et al.*, 2011).

25 Corroborando com esses autores, foi observado um menor potencial citotóxico
26 do óleo de *R. officinalis*, em comparação com os demais óleos nas células de melanoma
27 (B16F10). A composição química observada por Hussain *et al.* (2010; 2011) nos óleos
28 de alecrim e manjerona é semelhante à composição obtida no presente estudo, nos
29 mesmos óleos. A composição majoritária refletiu no potencial antiproliferativo dos
30 óleos em ambos os estudos, uma vez que o alecrim apresentou a pior atividade e a
31 manjerona, a melhor atividade, tanto nas células de melanoma murino, quanto nas
32 células de carcinoma prostático e mamário. Entretanto, deve-se levar em consideração
33

1 também o tipo de células tumorais utilizadas nos estudos anteriores, pois sabe-se da
2 diferença de comportamento nos diversos tipos tumorais (Marreli *et al.*, 2015).

3 O óleo essencial de *O. vulgare* também apresentou atividade citotóxica em
4 outras linhagens celulares de neoplasias humanas. Para a inibição da proliferação celular
5 nas linhagens de carcinoma uterino (HeLa), leucemia linfoblástica (CEM), carcinoma
6 mamário (MDA), carcinoma alveolar (A-549), adenocarcinoma mamário (MDA) e
7 adenocarcinoma colorretal (CaCo2) foram necessárias concentrações de 27,6 a 109,07
8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Vasko *et al.*, 2014), sendo inferiores àquelas obtida nas células de melanoma
9 (B16F10) aqui ensaiadas. Contudo, a composição química do óleo essencial avaliado
10 por Vasko *et al.* (2014) não foi determinada, podendo ser diferente da composição do
11 óleo essencial de orégano utilizado nesse estudo, o que poderia explicar a diferença nas
12 concentrações inibitórias, além dos tipos celulares diferentes.

13 Já Begnini *et al.* (2014), que avaliaram o óleo essencial de orégano, cujos
14 compostos majoritários foram 4-terpineol, timol, α -terpineno e α -terpineol, observaram
15 que o mesmo foi efetivo frente à linhagem de adenocarcinoma de colon (HT-29) em
16 uma concentração superior, de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Entretanto, a concentração tóxica em
17 células não tumorais não foi determinada pelos autores. Os compostos majoritários
18 presentes no óleo essencial de *O. vulgare* aqui avaliado, diferem dos obtidos nos
19 estudos apresentados, o que influencia diretamente nas diferenças nas concentrações
20 inibitórias entre eles.

21 A literatura sugere que alguns compostos podem apresentar sinergismo,
22 demonstrando uma melhor ação quando estão combinados, do que isoladamente,
23 podendo ainda haver influência dos compostos minoritários em sua atividade biológica
24 (Erdogan e Ozkan, 2013; Russo *et al.*, 2015), justificando a excelente ação
25 antiproliferativa observada nos óleos essenciais. A presença dos compostos majoritários
26 4-terpineol e γ -terpineno é relacionada na literatura com a ação biológica dos óleos
27 essenciais, uma vez que esses terpenos afetam a permeabilidade da membrana celular,
28 facilitando a passagem de íons e prótons, interferindo na sua integridade (Bakkali *et al.*,
29 2008; Grondona *et al.*, 2014).

30 Apesar de não estarem entre os compostos majoritários nos óleos analisados, a
31 literatura cita a atividade antiproliferativa dos monoterpenos timol e carvacrol em
32

1 células de melanoma murino, de carcinoma colorretal e de carcinoma hepático (Satooka
2 e Kubo, 2012; Ozkan e Erdogan, 2011; Cabello *et al.*, 2014).

3 Mitropoulou *et al.* (2015) compararam a atividade antiproliferativa do óleo
4 essencial de *O. dictamnus* com a atividade de seus compostos majoritários, carvacrol,
5 gama-terpineno, *p*-cymeno e linalol em células de carcinoma hepatocelular (HepG2).
6 Das substâncias testadas, apenas o carvacrol e o óleo essencial demonstraram atividade,
7 sendo o carvacrol isolado mais efetivo. Os demais compostos avaliados não
8 demonstraram atividade isoladamente (Mitropoulou *et al.*, 2015). Outros estudos
9 avaliaram também a atividade do linalol isolado em comparação com o óleo essencial
10 de alecrim, o qual apresentava linalol como composto majoritário, e observaram que a
11 mistura de compostos encontrada no óleo essencial foi mais efetiva do que o composto
12 isolado (Erdogan e Ozkan, 2013).

13 O ensaio de citotoxicidade mostrou-se uma importante ferramenta para a triagem
14 de plantas com potencial medicinal, pois complementa os testes de atividade biológica e
15 serve de orientação para os testes *in vivo* subsequentes. A determinação do potencial
16 tóxico dos produtos vegetais é de grande importância, tendo em vista a aplicabilidade
17 dos resultados, pois a toxicidade é um dos principais fatores limitantes para que um
18 extrato vegetal possa ser indicado como medicinal (Blank, 2013).

19 Os óleos essenciais de *O. vulgare* e *R. officinalis* e *O. majorana* apresentam
20 toxicidade na linhagem de células renais em sete das nove concentrações testadas, nas
21 quais a viabilidade celular foi de 23,8 a 33%. Resultados divergentes foram descritos
22 em um estudo, no qual somente em concentrações muito baixas, próximas a 0,023,
23 0,052 e 3,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não foi observada toxicidade dos óleos essenciais de alecrim,
24 orégano e manjerona, respectivamente, em células renais de bovino, canino, felino e de
25 coelho (Blank, 2013).

26 Alguns autores tem relacionado a presença de carvacrol nos óleos essenciais de
27 *Origanum vulgare* e *O. majorana* como responsável pela toxicidade celular (Jaafari, *et*
28 *al.*, 2007). Outra pesquisa utilizou compostos voláteis isolados para avaliação da
29 citotoxicidade *in vitro* em diferentes linhagens celulares hepáticas, epiteliais, de
30 linfócitos e de fibroblastos, demonstrando que o 4-terpineol, α -terpineol, terpinoleno, α -
31 pineno e 1,8 cineol foram os responsáveis pela citotoxicidade (Gonçalves *et al.*, 2010).
32 Dos compostos apontados pela literatura como tóxicos, apenas o terpinoleno, timol e
33

1 carvacrol não estavam presentes em nenhum dos óleos essenciais avaliados, justificando
2 a citotoxicidade dos mesmos na maioria das concentrações utilizadas.

3 Devido às múltiplas potencialidades terapêuticas encontradas na família
4 Lamiaceae, os óleos essenciais de outras plantas pertencentes a esta também estão sendo
5 testadas quanto à sua atividade anticancerígena. O *Origanum dictamnus* e *O. onites*
6 demonstraram atividade inibitória para a proliferação de células de carcinoma
7 hepatocelular humano (HepG2), nas concentrações de 69 e 149,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto
8 *O. syriacum* não foi efetivo e células de adenocarcinoma mamário (Al-Kalaldehy *et al.*,
9 2010; Erdogan e Ozkan, 2013; Mitropoulou *et al.*, 2015).

10 Em linhagens de melanoma, a *Tedradenia riparia* mostrou-se efetiva na
11 concentração de 272 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em células de melanoma murino e quatro espécies de
12 *Salvia*, *S. officinalis*, *S. aurea*, *S. judaica* e *S. viscosa* demonstraram efeito
13 antiproliferativo em células de melanoma humano (C32, M14, A2058, A375), em
14 concentrações 11,6 e 367,34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Loizzo *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2015; Russo
15 *et al.*, 2016).

16 A literatura demonstra que, mesmo em concentrações baixas, os óleos essenciais
17 de orégano, alecrim e manjerona exerceram atividade citotóxica em células tumorais,
18 podendo ser testados em concentrações menores do que as utilizadas no presente estudo,
19 a fim de verificar se essa propriedade frente à linhagem B16F10 se mantém satisfatória,
20 ao passo que sua toxicidade poderá ser reduzida.

21 22 Conclusões

23
24 Com os resultados evidenciados nesse estudo, conclui-se que os óleos essenciais
25 de *O. majorana* e de *O. vulgare* apresentam atividade antiproliferativa *in vitro* em
26 células de melanoma e representam promissoras fontes de estudo para o
27 desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos. O óleo essencial *R. officinalis*,
28 apesar de mostrar-se efetivo, apresentou toxicidade elevada na linhagem de células
29 renais utilizadas nesse estudo.

30
31
32

1 Referências bibliográficas

2

3 AL-KALALDEH, J.Z.; ABU-DAHAB, R; AFIFI, F.U. Volatile oil composition and
4 antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and
5 *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutr Res.*, v.30, p.271-278,
6 2010.

7

8 ARAÚJO, E.C.; OLIVEIRA, R.A.G.; CORIOLANO, A.T. Uso de plantas medicinais
9 pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública em João Pessoa (PB). *Espaç.*
10 *saúde*, Londrina, v.8, n.2, p.44-52, 2007.

11

12 BEGNINI, K.R.; NEDEL, F.; LUND, R.G. et al. Composition and antiproliferative
13 effect of essential oil of *Origanum vulgare* against tumor cell lines. *J Med Food*, v.17,
14 n.10, p.1129-1133, 2014.

15

16 BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. et al. Biological effects of essential
17 oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p.446-475, 2008.

18

19 BLANK, D. *Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de*
20 *plantas da família Lamiaceae*. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro
21 de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas,
22 Pelotas.

23

24 CABELLO, M.L.R.; PRAENA, D.G.; PICHARDO, S. et al., Cytotoxicity and
25 morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2.
26 *Food and Chemical Toxicology*, v.64, p.281–290, 2014.

27

28 BERGMAN, P.J.; KENT, M.S.; FARESE, J.P. Melanoma. In: WITHROW, S.J.; VAIL,
29 D.M.; PAGE, R.L. *Withrow & MacEwen's – Small Animal Clinical Oncology*.
30 Missouri: Elsevier, 2013. Cap.19, p.321-331.

31

32 ERDOGAN, A.; OZKAN, A. A comparative study of cytotoxic, membrane and DNA
33 damaging effects of *Origanum majorana*'s essential oil and its oxygenated monoterpene
34 component linalool on parental and epirubicin-resistant H1299 cells. *Biologia*, v.68, n.4,
35 p.754—761, 2013.

36

- 1 FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV – Parte I; 4ª ed., Atheneu: São Paulo; 1988.
- 2
- 3 GONÇALVES, M.J., CRUZ, M.T., CAVALEIRO, C.; LOPES, M.C., SALGUEIRO, L.
4 Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis*
5 subsp. *Sylvestris*. *Ind Crops Prod.*, 2010, 32, 70–75.
- 6
- 7 GRONDONA, E.; GATTI, G.; LÓPEZ, A. G. et al. Bio-efficacy of the essential oil of
8 oregano (*Origanum vulgare* Lamiaceae. Ssp. *Hirtum*). *Plant Food Hum Nutr.*, 2014.
- 9
- 10 HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; CHATHA, S.A.S. et al. *Rosmarinus officinalis* essential
11 oil: antiproliferative, antioxidante and antibacterial activities. *Braz. J. Microbiol.*, v.41,
12 p.1070-1078, 2010.
- 13
- 14 HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; RASHEED, S. et al. Composition, antioxidante and
15 chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing
16 in Pakistan. *Rev. bras. farmacog.*, v.21, n.6, p.943-952, 2011.
- 17
- 18 JAAFARI, A.; MOUSE, H.A.; RAKIB, E.M. et al. Chemical composition and
19 antitumor activity of different wild varieties of *Moroccan thyme*. *Rev. bras. farmacog.*,
20 v.17, n.4, p.477-491, 2007.
- 21
- 22 LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com
23 ação biológica e antioxidante. *Revista Fitos*, v.3, n.3, 2007.
- 24
- 25 LOIZZO, M.R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F. et al. Cytotoxic activity of essential oils
26 from Labiatae and Lauraceae families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer*
27 *Res.*, v.27, p.3291-3300, 2007.
- 28
- 29 MARINHO, M.L.; ALVES, M.S.; RODRIGUES, M.L.C. et al. A utilização de plantas
30 medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. *Ver. Bras. Pl. Med.*,
31 v.9, n.3, p.64-69, 2007.
- 32
- 33 MITROPOULOU, G.; FITSIOU, E.; STAVROPOULOU, E. Composition,
34 antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of *Origanum dictamnus*
35 (*dittany*) essential oil. *Microb Ecol Health Dis.*, v.26, 2015.

- 1 MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.O. et al. *In vitro* cytotoxic activity
2 of Brazilian Middle West plant extracts. *Rev. bras. farmacog.*, v.21, n.3, p.456-464,
3 2011.
- 4
- 5 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J Immunol*
6 *Methods*, v.65, p.55-63, 1983.
- 7
- 8 OLIVEIRA, P.F.; ALVES, J.M.; DAMASCENO, J.L. et al. Cytotoxicity screening of
9 essential oils in cancer cell lines. *Rev. bras. farmacog.*, v.25, p.183-188, 2015.
- 10
- 11 OZKAN, A.; ERDOGAN, A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer
12 activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic
13 components. *Turkish Journal of Biology*, v.35, p.735-742, 2011.
- 14
- 15 RAO, S.; BIBECHANA, T.; VARALAKSHMI, K. N. Evaluation of the anticancer
16 potentials of *Origanum marjorana* on fibrosarcoma (HT-1080) cell line. *Asian Pac J*
17 *Trop Dis*, n.4, p.389-394, 2014.
- 18
- 19 ROLIM, V.M.; CASAGRANDE, R.A.; WATANABE, T.T. et al. Melanoma
20 amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização
21 imuno-histoquímica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.4, p.340-346, 2012.
- 22
- 23 RUSSO, A.; FORMISANO, C.; RIGANO, D. et al. Comparative phytochemical profile
24 and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three
25 lebanese *Salvia* species. *Indus Crops Prod*, 2016.
- 26
- 27 RUSSO, R.; CORASANITI, M.T.; BAGETTA, G. et al. Exploitation of cytotoxicity of
28 some essential oils for translation in cancer therapy. *Evid Based Complement Alternat*
29 *Med.*, v.2015, p.1-9, 2015.
- 30
- 31 SATOOKA, H.; KUBO, I. Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells. *J Agric Food*
32 *Chem.*, v.60, p.2746-2752, 2012.
- 33
- 34 SCHIFFMAN, J.D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species
35 can teach us about humans with cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, v.370,
36 p.1-13, 2015.

- 1 SOLOWEY, E.; LICHTENSTEIN, M.; SALLON, S. et al. Evaluating medicinal plants
2 for anticancer activity. *Scientific World Journal*, 2014.
3
- 4 VASKO, L., VASKOVA, J., FERJEKACOVA, A. et al. Comparison of some
5 antioxidant properties of plants extrats from *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*,
6 *Eleutherococcus senticosus* and *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, v.50,
7 n.7, p.614-622, 2014.

4.2 Artigo 2

Efeito citotóxico *in vitro* de extratos hidroalcóolicos de plantas medicinais em células de melanoma

SILVA, Cristine Cioato*; GIORDANI, Claudia; GUTERRES, Karina Affeldt;
MATOS, Caroline Bohnen; PICOLI, Tony; FISCHER, Geferson; CLEFF, Marlete
Brum

Será submetido à revista Semina

1 **Efeito citotóxico *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais em células de**
2 **melanoma**

3
4 SILVA, Cristine Cioato*; GIORDANI, Claudia; GUTERRES, Karina Affeldt; MATOS, Caroline
5 Bohnen; PICOLI, Tony; FISCHER, Geferson; CLEFF, Marlete Brum

6 Universidade Federal de Pelotas

7 *Autor para correspondência: Campus Universitário, s/n° - CEP: 96160-000, Capão do Leão, RS/BR

8 E-mail: criscioato@hotmail.com
9

10 **RESUMO**

11 O melanoma é uma neoplasia melanocítica com grande importância na oncologia veterinária por ser um
12 tumor invasivo, altamente metastático e pouco responsivo ao tratamento quimioterápico convencional.
13 Impulsionadas pela resistência neoplásica à quimioterapia, as pesquisas com compostos fitoquímicos tem
14 recebido atenção especial nos últimos anos, pois esses são promissores agentes para prevenção e tratamento
15 do câncer. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos
16 hidroalcoólicos de *Origanum vulgare*, *Bauhinia forficata*, *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora* em
17 células de melanoma murino. Para isso, foram avaliadas nove concentrações dos extratos hidroalcoólicos de
18 cada planta nas linhagens celulares B16F10 e MDBK, em 24 e em 48 horas. Os extratos avaliados
19 apresentaram atividade celular antiproliferativa em células tumorais e normais dependente do tempo e da
20 dose, tendo maiores porcentagens de inibição celular em 48 horas do que em 24. Os extratos hidroalcoólicos
21 de *B. forficata*, *E. uniflora* e *O. vulgare* em 48 horas, apresentaram resultados antiproliferativos em células
22 de melanoma, uma vez que atingiram moderada atividade inibitória nas células B16F10 em concentrações
23 com baixa toxicidade para as células normais. O extrato de *S. terebinthifolius* não exibiu atividade
24 satisfatória nas células tumorais, quando cruzadas as concentrações efetivas e tóxicas.

25 **Palavras-chave:** Câncer; Cultivo celular; Aroeira; Pata-de-vaca; Pitangueira; Orégano

26 **ABSTRACT**

27 Melanoma is a melanocytic neoplasm with great importance in veterinary oncology to be an invasive, highly
28 metastatic and poorly responsive to conventional chemotherapy tumor. Driven by neoplastic chemotherapy
29 resistance, research on phytochemicals compounds has received special attention in recent years because
30 these are promising agents for the prevention and treatment of cancer. In this context, the aim of this study
31 was to evaluate the cytotoxic activity *in vitro* of hydroalcoholic extracts of *Origanum vulgare*, *Bauhinia*
32 *forficata*, *Schinus terebinthifolius* and *Eugenia uniflora* in murine melanoma cells. To this, we were
33 evaluated nine concentrations of hydroalcoholic extracts of each plant in MDBK and B16F10 cell lines, 24
34 and 48 hours. The evaluated cell extracts showed antiproliferative activity on tumor and normal cells
35 dependent on time and dose, with higher percentages of cellular inhibition at 48 hours than at 24. The
36 hydroalcoholic extracts of *B. forficata*, *E. uniflora* and *O. vulgare* 48 hours showed antiproliferative results
37 in melanoma cells, once reached moderate inhibitory activity on B16F10 cells at concentrations with low
38

1 toxicity for normal cells. The extract of *S. terebinthifolius* not exhibited satisfactory activity in tumor cells
2 when cross the effective and toxic concentrations.

3

4 **Keywords:** Cancer; Cell culture; *Bauhinia forficata*; *Eugenia uniflora*; *Origanum vulgare*; *Schinus*
5 *terebinthifolius*

6

7 **Introdução**

8

9 O melanoma é uma neoplasia mucocutânea originada de células melanocíticas que acomete diversas
10 espécies, sendo comum em cães, felinos e em humanos (BERGMAN et al, 2013; SCHIFFMAN E BREEN,
11 2015). Apesar de ter uma frequência entre três e 20%, o melanoma tem grande importância na oncologia
12 veterinária por tratar-se de um tumor invasivo, altamente metastático e pouco responsivo ao tratamento
13 quimioterápico convencional, principalmente nos estágios mais avançados (SOUZA et al., 2006;
14 MEIRELLES et al., 2010; ROLIM et al., 2012; BERGMAN et al., 2013). A resistência dos neoplasmas aos
15 fármacos quimioterápicos, impulsionou a busca pelo desenvolvimento de novas drogas anticâncer, mais
16 eficazes, seguras e mais acessíveis (RUSSO et al., 2016).

17 Os compostos químicos derivados de plantas vem sendo utilizados para fins medicinais desde a
18 antiguidade e, tem recebido atenção especial ao longo das últimas três décadas, por apresentarem-se como
19 promissores agentes para prevenção e tratamento do câncer (GORDALIZA et al., 2007; NEWMAN, 2008).
20 Os extratos de *Origanum vulgare*, *Schinus terebinthifolius*, *Eugenia uniflora* e *Bauhinia forficata* apresentam
21 diversas atividades terapêuticas comprovadas, atuando como antimicrobianos, hipoglicemiantes,
22 cicatrizantes, entre outras e vem sendo testados, assim como seus compostos isolados, quanto à ação
23 anticancerígena, em diversos tipos de tumores, incluindo em linhagens humanas de melanoma (MAHMOUD
24 et al., 2011; MATSUO et al., 2011; MICELI et al., 2012; GIORDANI, 2013; SANTIN et al., 2014; ;
25 GUTERRES, 2015; MARRELI et al., 2015).

26 Entretanto, mesmo com os avanços das pesquisas realizadas com plantas medicinais, várias espécies
27 ainda são utilizadas segundo as orientações da medicina popular, sem conhecimento de seu potencial tóxico
28 (GIORDANI, 2013). A partir disso, observa-se a importância da realização de testes de toxicidade, tendo em
29 vista a aplicabilidade dos resultados, pois a elevada toxicidade de alguns produtos vegetais inviabiliza o seu
30 uso com fins medicinais (BLANK, 2013). Além disso, os testes toxicológicos *in vitro* servem como
31 orientação para os testes *in vivo* com modelos experimentais e para os ensaios clínicos (BEDNARCZUK et
32 al., 2010).

33 Frente ao exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos
34 hidroalcoólicos de *Origanum vulgare*, *Bauhinia forficata*, *Schinus terebinthifolius* e *Eugenia uniflora* em
35 células de melanoma murino e em células renais bovinas.

36 .

1 **Material e Métodos**

2

3 *Obtenção e preparo do material vegetal*

4 As folhas secas de *Origanum vulgare* foram adquiridas de distribuidor comercial (Lote n°: 00814)
5 com laudo de certificação botânica. *Schinus terebinthifolius*, *Eugenia uniflora* e *Bauhinia forficata* foram
6 colhidas na região do Pelotas/RS, e uma amostra de cada planta foi prensada e encaminhada para o Setor de
7 Botânica da Universidade Federal de Pelotas para identificação do gênero e espécie.

8 As plantas foram secas em estufa com circulação de ar à temperatura de 35°C e embaladas em papel
9 pardo, sendo por fim, trituradas e pesadas em balança de precisão. Os extratos vegetais foram preparados
10 utilizando 50g de planta e 500mL de álcool de cereais 70%, sendo estas tinturas armazenadas em frascos
11 estéreis hermeticamente fechados, protegidas da luz em temperatura ambiente, e homogeneizadas de forma
12 manual diariamente, durante um minuto. Após sete dias, as tinturas foram filtradas com gaze estéril e
13 reconstituídas ao volume inicial com álcool de cereais 70%, ficando armazenadas até o uso. Para obtenção
14 dos extratos hidroalcoólicos, utilizou-se rotaevaporador a vácuo em temperatura de 40°C para retirada do
15 solvente, e posteriormente o volume inicial foi restituído com água destilada estéril (SCHIEDECK et al.,
16 2008).

17 Para avaliação da atividade citotóxica, foram utilizadas nove concentrações dos extratos
18 hidroalcoólicos, que foram de 6,25 a 0,02 mg mL⁻¹ em diluições seriadas e em triplicatas.

19

20 *Cultivos celulares*

21 As linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) e de rim bovino (MDBK), foram gentilmente
22 cedidas pela Fundação Universidade de Rio Grande e pelo Laboratório de Virologia (LABVIR) – UFPel,
23 respectivamente. Durante o experimento, as células foram mantidas em MEM (meio essencial mínimo),
24 acrescido de antibiótico, antifúngico e soro fetal bovino a 10%, sendo armazenadas em estufa a 37°C com
25 atmosfera úmida com 5% de CO₂.

26

27 *Teste de citotoxicidade*

28 Para os testes, as células foram semeadas em placas de 96 poços, onde foram adicionados os extratos
29 hidroalcoólicos (OR24/OR48 – extrato hidroalcoólico de *O. vulgare*, PV24/PV48 – extrato hidroalcoólico de
30 *Bauhinia forficata*, PIT24/PIT48 – extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora*, ARO24/ARO48 – extrato
31 hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*) em triplicata, nas seguintes concentrações (mg mL⁻¹): 6,25, 3,12,
32 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,09, 0,04 e 0,02.

33 A viabilidade celular, tanto nas células de melanoma (B16F10) quanto em MBDK, foi avaliada após
34 24 e 48 horas de incubação a 37°C com 5% de CO₂, utilizando o ensaio MTT, com posterior leitura em
35 espectrofotômetro (540 nm) (MOSMANN, 1983). Células tratadas somente com MEM foram usadas como
36 controles. As concentrações dos extratos foram classificadas de acordo com Mahmoud et al. (2011), levando
37 em consideração o potencial antiproliferativo e tóxico, sendo considerada atividade/citotoxicidade alta,

38

quando a viabilidade celular estiver entre 1 e 50%; atividade /toxicidade moderada se a viabilidade celular ficar entre 51 e 75% e baixa atividade/toxicidade, quando a viabilidade celular estiver entre 75 e 100%.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com Statistix 9.0, utilizando análise de variância (ANOVA), comparando as médias de viabilidade celular pelo teste de Tukey em relação aos diferentes extratos, às concentrações utilizadas e aos diferentes tempos de incubação. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

Todos os extratos avaliados apresentaram atividade antiproliferativa nas células de melanoma. Os extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade dependente do tempo e da dose avaliada, maiores porcentagens de inibição em 48 horas do que em 24 (Tab. 1 e 2).

Tabela 1. Médias da viabilidade celular da linhagem B16F10 obtida por cada extrato, em diferentes concentrações em 24 e 48 horas.

Extratos	Concentrações (mg mL ⁻¹)								
	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09	0,04	0,02
ARO24	100 ^A	97 ^A	83 ^{AB}	100 ^A	100 ^A	100 ^A	98 ^A	96 ^{AB}	89 ^{AB}
ARO48	84 ^{AB}	80 ^{AB}	55 ^C	47 ^C	47 ^E	41 ^D	48 ^C	62 ^B	63 ^{BC}
PIT24	62 ^{BC}	69 ^{AB}	83 ^{AB}	94 ^A	90 ^{AB}	76 ^{BC}	70 ^{BC}	83 ^{AB}	100 ^A
PIT48	60 ^{BCD}	63 ^B	51 ^C	52 ^{BC}	57 ^{DE}	62 ^C	58 ^C	73 ^{AB}	69 ^{BC}
OR24	44 ^{CD}	87 ^{AB}	100 ^A	94 ^A	100 ^A	100 ^A	100 ^A	100 ^A	100 ^A
OR48	36 ^D	33 ^C	60 ^C	61 ^{BC}	82 ^{BC}	70 ^{BC}	68 ^{BC}	70 ^{AB}	60 ^C
PV24	79 ^{AB}	84 ^{AB}	86 ^{AB}	89 ^A	90 ^{AB}	90 ^{AB}	87 ^{AB}	72 ^{AB}	71 ^{BC}
PV48	65 ^{BC}	76 ^{AB}	70 ^{BC}	69 ^B	69 ^{CD}	67 ^C	69 ^{BC}	71 ^{AB}	68 ^{BC}

Letras diferentes sobre as médias indicam diferença estatística, com $p < 0,05$. ARO: extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius*); PIT: extrato hidroalcoólico de pitangueira (*Eugenia uniflora*); OR: extrato hidroalcoólico de orégano (*Origanum vulgare*); PV: extrato hidroalcoólico de pata de vaca (*Bauhinia forficata*). Os números 24 e 48 após as siglas dos extratos representam o tempo de incubação – 24 e 48 horas.

1 Tabela 2. Médias da viabilidade celular da linhagem MDBK obtida por cada extrato, em diferentes
2 concentrações em 24 e 48 horas.

Extratos	Concentrações (mg mL ⁻¹)								
	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09	0,04	0,02
ARO24	97 ^A	77 ^B	68 ^B	56 ^C	74 ^B	75 ^B	78 ^C	77 ^B	95 ^A
ARO48	59 ^{BC}	45 ^C	36 ^C	30 ^D	31 ^C	30 ^C	31 ^E	31 ^C	47 ^C
PIT24	60 ^{BC}	54 ^C	58 ^B	62 ^{BC}	59 ^B	73 ^B	81 ^{BC}	79 ^{AB}	99 ^A
PIT48	28 ^{DE}	26 ^{DE}	23 ^C	26 ^D	30 ^C	30 ^C	59 ^D	41 ^C	83 ^A
OR24	44 ^{CD}	41 ^{CD}	36 ^C	83 ^{AB}	96 ^A	100 ^A	100 ^A	100 ^{AB}	99 ^A
OR48	23 ^B	22 ^E	21 ^C	79 ^{ABC}	94 ^A	98 ^A	100 ^A	100 ^{AB}	93 ^B
PV24	75 ^B	95 ^A	98 ^A	100 ^A	99 ^A	94 ^A	95 ^{AB}	92 ^{AB}	91 ^A
PV48	48 ^C	98 ^A	86 ^A	96 ^A	95 ^A	93 ^A	91 ^{ABC}	92 ^{AB}	86 ^A

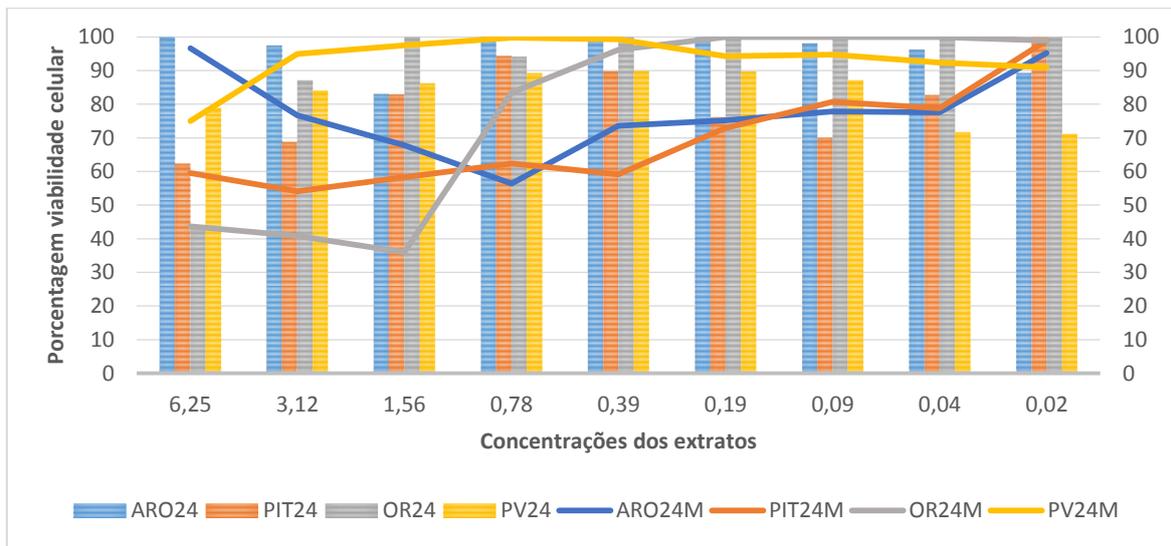
3 Letras diferentes sobre as médias indicam diferença estatística, com $p < 0,05$. ARO: extrato hidroalcoólico de
4 aroeira (*Schinus terebinthifolius*); PIT: extrato hidroalcoólico de pitangueira (*Eugenia uniflora*); OR: extrato
5 hidroalcoólico de orégano (*Origanum vulgare*); PV: extrato hidroalcoólico de pata de vaca (*Bauhinia*
6 *forficata*). Os números 24 e 48 após as siglas dos extratos representam o tempo de incubação – 24 e 48 horas.

7

8 Após 24 horas de incubação, o extrato de pitangueira, nas concentrações de 6,25 e 0,19 mg mL⁻¹
9 exibiu atividade antiproliferativa moderada nas células B16F10 e citotoxicidade na linhagem MDBK
10 também moderada, com porcentagens de viabilidade celular muito próximas nessas concentrações. Um
11 resultado mais favorável foi obtido com esse extrato na concentração de 0,09 mg mL⁻¹, onde a viabilidade
12 celular foi de 70% nas células de melanoma e 81% nas células renais, representando moderada atividade
13 antiproliferativa e baixa citotoxicidade.

14 Ainda em 24 horas, as concentrações de 0,02 e 0,04 mg mL⁻¹ do extrato de pata-de-vaca resultaram
15 em viabilidades celulares na linhagem B16F10 de 72 e 71%, evidenciando também atividade moderada desse
16 extrato. Porém, as mesmas concentrações provocaram baixa toxicidade nas células MDBK, que
17 apresentaram viabilidades superiores a 90%. As demais concentrações do extrato hidroalcoólico de *B.*
18 *forficata*, apesar de exibirem baixa toxicidade, tiveram baixa efetividade nas células tumorais, assim como
19 observado com o extrato de *S. terebinthifolius*. Já o extrato de orégano apresentou alto potencial citotóxico
20 (44%) na maior concentração avaliada (6,25 µg mL⁻¹), no entanto, com toxicidade elevada. Nas demais
21 concentrações, OR24 exibiu baixa capacidade antitumoral e baixa citotoxicidade (Fig. 1).

22

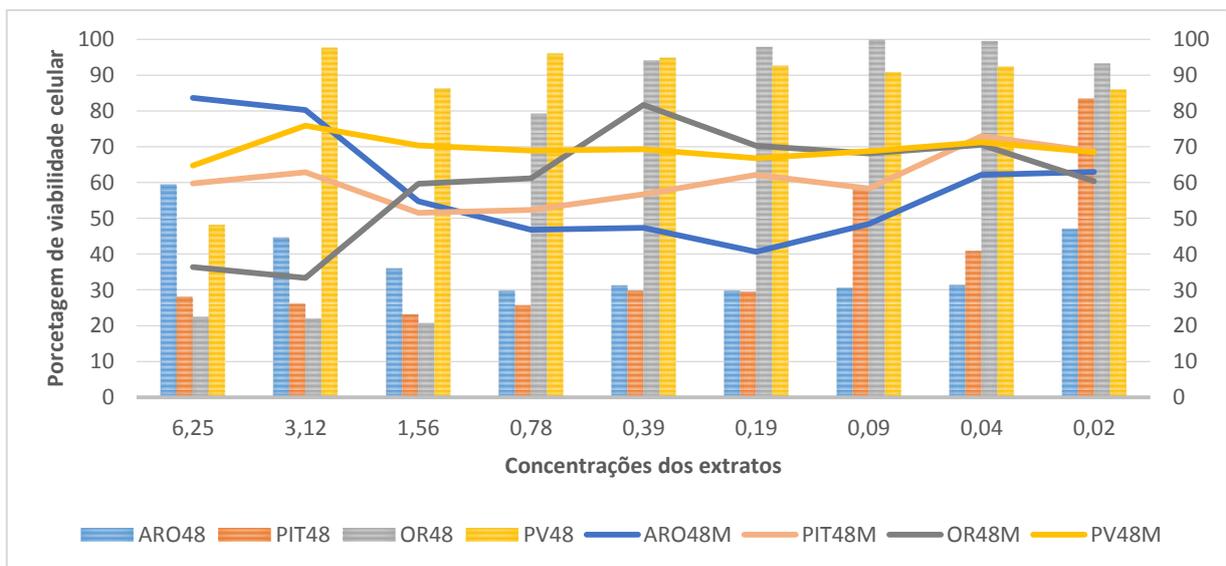


1

2 Figura 1. Demonstração da viabilidade celular após 24 horas de contato com os extratos, onde as colunas
 3 representam a atividade dos extratos em células B16F10 e as linhas, em células MDBK. ARO: extrato
 4 hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius*); PIT: extrato hidroalcoólico de pitangueira (*Eugenia*
 5 *uniflora*); OR: extrato hidroalcoólico de orégano (*Origanum vulgare*); PV: extrato hidroalcoólico de pata-de-
 6 vaca (*Bauhinia forficata*).

7

8 Após um período de incubação de 48 horas, todos os extratos exibiram atividade antiproliferativa
 9 moderada nas células de melanoma murino em alguma das concentrações testadas, com baixa citotoxicidade.
 10 Somente no ARO48, todas as concentrações foram altamente tóxicas para as células MDBK. Os extratos de
 11 OR48 e PV48 exibiram inibição moderada na linhagem B16F10 nas concentrações entre 0,78 a 0,02 mg mL⁻¹,
 12 com viabilidades entre 60 e 70% nas células tratadas com o extrato de orégano e entre 67 e 71%, naquelas
 13 tratadas com o extrato de pata-de-vaca. Nessas concentrações, a toxicidade dos extratos OR48 e PV48 foi
 14 considerada baixa. Na concentração de 0,02 mg mL⁻¹, PIT48 também exibiu atividade inibitória moderada e
 15 baixa toxicidade, com viabilidade celular de 69% nas células B16F10 (Fig. 2).



16

17 Figura 2. Demonstração da viabilidade celular após 48 horas de contato com os extratos, onde as colunas
 18 representam a atividade dos extratos em células B16F10 e as linhas, em células MDBK. ARO: extrato

19

1 hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius*); PIT: extrato hidroalcoólico de pitangueira (*Eugenia*
2 *uniflora*); OR: extrato hidroalcoólico de orégano (*Origanum vulgare*); PV: extrato hidroalcoólico de pata-de-
3 vaca (*Bauhinia forficata*).

4

5 O trabalho é pioneiro na avaliação da atividade citotóxica dos extratos de aroeira, pitangueira,
6 orégano e pata-de-vaca em células de melanoma murino (B16F10), não sendo encontrados estudos avaliando
7 estes extratos neste tipo celular, sendo a ação anticancerígena dessas plantas avaliada em outras linhagens
8 celulares tumorais e normais (MAHMOUD et al., 2011; MATSUO et al., 2011; MICELI et al., 2012;
9 MARRELI et al., 2015).

10 A atividade antiproliferativa vinculada à dose tem sido evidenciada por outros autores. Marreli e
11 colaboradores (2015) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* na concentração de 100 µg
12 mL⁻¹ inibiu a proliferação da linhagem de carcinoma mamário humano (MCF-7), reduzindo em 50% a
13 viabilidade celular. Atividade dependente da concentração também foi observada por Koldas et al. (2014),
14 atingindo níveis crescentes de inibição em células da linhagem HeLa, de carcinoma uterino humano, com
15 os extratos metanólico, aquoso e etanólico de orégano, sendo 250 µg mL⁻¹ a concentração inibitória máxima,
16 chegando a uma viabilidade celular de 0%. Ainda em células HeLa, o extrato acetônico de orégano, inibiu
17 em 50% a viabilidade celular, na concentração de 126 µg mL⁻¹ (BERRINGTON; LALL, 2012). Apesar dos
18 resultados promissores, nenhum dos autores avaliou a toxicidade dos extratos em células não tumorais. Em
19 nosso estudo, na avaliação do extrato hidroalcoólico de orégano em células de melanoma murino, a atividade
20 inibitória foi considerada moderada, no entanto somente foram consideradas as concentrações cuja
21 toxicidade fosse moderada ou baixa. Quando considerada a toxicidade, a melhor concentração inibitória do
22 extrato de *O. vulgare* foi 0,02 mg mL⁻¹ (20 µg mL⁻¹), exibindo viabilidade celular de 60%, sendo superior às
23 apresentadas por outros autores (KOLDAS et al., 2014; MARRELI et al., 2015), porém, com toxicidade
24 moderada.

25 A toxicidade de extratos de orégano já foi avaliada em células renais de diferentes espécies de
26 mamíferos, em fibroblastos e em colonócitos humanos (BERRINGTON; LALL, 2012; SAVINI et al., 2012;
27 BLANK, 2013). Em células de macaco da linhagem Vero, a concentração tóxica estabelecida para o extrato
28 acetônico foi de 164 µg mL⁻¹, enquanto para os colonócitos e fibroblastos, a concentração tóxica foi superior
29 a 500 µg mL⁻¹ com o extrato etanólico (BERRINGTON; LALL, 2012; SAVINI et al., 2012). Em células
30 renais de felino, canino, bovino e coelho, Blank (2013) avaliaram a citotoxicidade dos extratos aquosos e
31 etanólico de *O. vulgare*, demonstrando que em concentrações a partir de 50 µg mL⁻¹ os extratos aquosos de
32 orégano não comprometeram as células MDCK, CRFK e MDBK, que tiveram viabilidade de 100%. O
33 extrato etanólico de *O. vulgare* para as células MDCK em concentrações iguais ou inferiores a 25 µg mL⁻¹
34 não apresentou toxicidade, enquanto que para as células RK13 e MDBK viabilidade celular de 100% foi
35 observada a partir da concentração de 12,5 µg mL⁻¹ (BLANK, 2013). No presente estudo, a toxicidade do
36 extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* em células MDBK diminuiu a medida que as concentrações testadas
37 foram menores, porém, houve um aumento da toxicidade proporcional ao tempo de incubação. Nas
38

1 concentrações de 0,78 a 0,02 mg mL⁻¹ (780 a 20 µg mL⁻¹), a toxicidade do extrato foi considerada moderada
2 ou baixa, sem perda total da atividade antitumoral.

3 O extrato hidroalcolico de *Schinus terebinthifolius*, foi capaz de inibir em 30% a proliferação de
4 células de melanoma humano da linhagem MDA-MB-435, na concentração de 100 µg mL⁻¹, em 72 horas
5 (MAHMOUD et al., 2011). Nas concentrações de 90 e 190 µg mL⁻¹ em 48 horas, o extrato de aroeira inibiu a
6 proliferação das células de melanoma murino em 52 e 60%, respectivamente, apresentando melhor atividade
7 nessas células do que na linhagem humana de melanoma. Porém, o extrato também foi altamente tóxico para
8 as células renais em todas as concentrações avaliadas.

9 Apesar da alta toxicidade *in vitro* do extrato hidroalcolico observada nas células MDBK, o extrato
10 de *S. terebinthifolius* necessita de uma avaliação aprofundada em relação atividade/citotoxicidade. Em
11 estudos realizados por outros autores não foram relatados sinais de irritação cutânea em humanos, nos quais
12 foi avaliada a toxicidade *in vivo* do extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* (JORGE et al., 2012). No
13 mesmo estudo, também não foi observada toxicidade em amostras de epiderme (JORGE et al., 2012). Sabe-
14 se que os dados de toxicidade obtidos em testes *in vitro* podem superestimar a real toxicidade de uma
15 substância *in vivo*, pois as estruturas dos tecidos e os processos de biotransformação e de transporte não são
16 simulados nos cultivos celulares (REICHLING, et al. 2009), salientando a importância da continuidade dos
17 testes de toxicidade com o extrato de *S. terebinthifolius*, uma vez que exibiu bons resultados frente às células
18 tumorais.

19 Testes *in vivo* já foram realizados para avaliar a atividade de um composto isolado do óleo de *S.*
20 *terebinthifolius*, o alfa-pineno, em ratos inoculados com melanoma metastático (MATSUO et al., 2011). Os
21 autores observaram que os animais tratados com o composto isolado, na dose de 10 mg mL⁻¹, apresentaram
22 menos nódulos metastáticos nos pulmões do que aqueles que não receberam, sem demonstrar sinais de
23 toxicidade (MATSUO et al., 2011). Devido à comprovada eficácia dos produtos obtidos a partir da aroeira,
24 observa-se a importância da análise da composição química do extrato avaliado, com o intuito de identificar
25 os possíveis compostos efetivos, bem como a sua toxicidade, visando a sua aplicabilidade em estudos *in vivo*.

26 O extrato aquoso das folhas da pitangueira demonstrou alta atividade inibitória em células humanas
27 de carcinoma colorretal (HT29) e carcinoma pulmonar (H460), na concentração de 100 µg mL⁻¹, reduzindo a
28 viabilidade celular para 12 e 11%, respectivamente, em 72 horas de incubação (MONKS et al., 2002). Em
29 células humanas de glioblastoma (SF-295), de carcinoma de colon (HCT-8) e de melanoma humano (MDA-
30 MB-435), o extrato etanólico do caule da pitangueira, na mesma concentração e tempo de incubação, inibiu
31 em 75, 85 e 96% a proliferação celular, respectivamente (MAHMOUD et al., 2011). Já na linhagem de
32 carcinoma mamário (MCF-7), foram necessárias 150 µg mL⁻¹ para inibir 50% das células, em 48 horas
33 (SUPRIYATI et al., 2011). Na linhagem celular de melanoma murino avaliada, o extrato hidroalcolico das
34 folhas de pitangueira na concentração de 90 µg mL⁻¹ reduziu a viabilidade celular para 70%, em 24 horas,
35 sem efeitos tóxicos nas células renais (MDBK). Em 48 horas, se desconsiderada toxicidade em MDBK, a
36 porcentagem de viabilidade celular da linhagem B16F10 cai para 58%. Apesar das diferenças entre os tipos
37 celulares e entre os tipos de extratos utilizados, é possível considerar que *E. uniflora* apresenta atividade
38 antitumoral, atuando em diversos tipos celulares.

1 A baixa toxicidade do extrato etanólico de *E. uniflora* foi demonstrada por Santos et al. (2012), em
2 macrófagos murinos, nos quais a concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ provocou 8% de redução na viabilidade
3 celular. Já o extrato aquoso e o óleo essencial das folhas da pitangueira não demonstraram toxicidade aguda
4 *in vivo*, na dose de 300 mg mL^{-1} do extrato e de 200 mg mL^{-1} de óleo essencial (SCHAPOVAL et al., 1994;
5 VICTORIA et al., 2012). Frente à linhagem MDBK, o extrato hidroalcólico de pitangueira apresentou
6 concentrações com baixa toxicidade, as quais ainda apresentavam moderada atividade citotóxica nas células
7 de melanoma. A literatura aponta os testes de citotoxicidade como o ponto de partida para o delineamento do
8 potencial tóxico de uma planta, que é um fator limitante para o seu uso clínico (BEDNARZUK, et al., 2010).

9 O extrato etanólico de *B. forficata* inibiu a proliferação de células de melanoma humano (FO-1) na
10 concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 51% após 24 horas de incubação, e em 42%, após 48 horas, não
11 apresentando toxicidade em linfócitos humanos (MICELI et al., 2012). Os autores observaram ainda que o
12 uso do extrato foi seguro em testes *in vivo*, não sendo letal para o modelo experimental *Artemia salina*,
13 mesmo em concentrações elevadas (dose letal > 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (MICELI et al., 2012). Em células de
14 melanoma murino, o extrato de pata-de-vaca apresentou atividade inibitória moderada e dependente do
15 tempo e da concentração, demonstrando um número maior de concentrações efetivas em 48 horas do que em
16 24 horas. Porém, a viabilidade mínima observada com o extrato de *B. forficata* na linhagem B16F10 foi
17 67%, na concentração de 0,39 mg mL^{-1} (390 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em 48 horas. Assim, como observado por Miceli e
18 colaboradores (2012), a toxicidade em células normais não aumentou em relação ao tempo, sendo baixa na
19 maioria das concentrações.

20 Príncipe; Spira, 2009, demonstraram que o extrato metanólico de *B. forficata* não foi capaz de inibir a
21 proliferação de células de leucemia humana (Jurkat cells), em concentrações de 1 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
22 Entretanto, os autores observaram que o extrato foi capaz de inibir a expressão do conjunto de enzimas
23 glutationa S-transferase (GST) na mesma linhagem celular, sendo capaz de reduzir os níveis de expressão
24 dessas enzimas e, conseqüentemente, reduzir também a resistência aos quimioterápicos em células
25 neoplásicas (PRINCIPE; SPIRA, 2009). Outro efeito importante do extrato de *B. forficata* foi observado em
26 ratos Wistar tratados com ciclofosfamida, nos quais o extrato foi administrado pela via oral, na concentração
27 de 4,65 g.L^{-1} (465 mg mL^{-1}) (DUSMAN et al., 2013). A avaliação histopatológica da medula óssea desses
28 animais demonstrou que os animais tratados com o extrato tiveram menos danos celulares do que os não
29 foram tratados, evidenciando um efeito celular protetivo frente a possíveis danos que podem ser induzidos
30 por agentes quimioterápicos (DUSMAN et al., 2013). Esse efeito protetivo foi relacionado pelos autores à
31 composição química dos extratos, que é rica em flavonoides, os quais apresentam importante potencial
32 antioxidante (DUSMAN et al., 2013).

33 Fatores como o tipo celular utilizado para a avaliação dos extratos, o tipo de solvente utilizado para a
34 extração e a composição química dos extratos estudados certamente influenciam na sua atividade biológica
35 (LIMA; CARDOSO, 2007). Porém, diante dos resultados obtidos e dos trabalhos realizados por outros
36 autores, é possível perceber que as plantas avaliadas apresentam atividades semelhantes, demonstrando
37 atividade citotóxica nos testes *in vitro*.

1 Os extratos hidroalcoólicos de *Origanum vulgare*, *Bauhinia forficata*, *Schinus terebinthifolius* e
2 *Eugenia uniflora* apresentaram atividade celular antiproliferativa em células tumorais e normais dependente
3 do tempo e da dose, tendo maiores porcentagens de inibição celular em 48 horas do que em 24. Porém, os
4 extratos vegetais testados apresentaram atividade semelhante nas duas linhagens celulares utilizadas, tendo
5 atividade antiproliferativa em concentrações muito próximas às tóxicas, sugerindo a necessidade de ampliar
6 os testes de toxicidade com outros tipos celulares e, posteriormente, com modelos experimentais *in vivo*.

7

8 **Conclusões**

9

10 Os extratos hidroalcoólicos de *B. forficata*, *E. uniflora* e *O. vulgare* em 48 horas, apresentaram
11 resultados antiproliferativos em células de melanoma, uma vez que atingiram moderada atividade inibitória
12 nas células B16F10 em concentrações com baixa toxicidade para as células normais. O extrato de *S.*
13 *terebinthifolius* não exibiu atividade satisfatória nas células tumorais, quando cruzadas as concentrações
14 efetivas e tóxicas.

15 Diante dos resultados, conclui-se que os extratos vegetais avaliados são fontes promissoras para a
16 descoberta de novos compostos que poderão ser empregados na terapia antineoplásica.

17

18 **Referências Bibliográficas**

19

20 BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Teste *in vitro* e *in vivo*
21 utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

22

23 BERGMAN, P.J.; KENT, M.S.; FARESE, J.P. Melanoma. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L.
24 **Withrow & MacEwen's – Small Animal Clinical Oncology**. Missouri: Elsevier, 2013. Cap.19, p.321-331.

25

26 BERRINGTON, D.; LALL, N. Anticancer activity of certain herbs and spices on the cervical epithelial
27 carcinoma (HeLa) cell line. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2012, p.1-11,
28 2012.

29

30 BLANK, D. *Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família*
31 *Lamiaceae*. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e
32 de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

33

34 DUSMAN, E.; ALMEIDA, I.V.; COELHO, A.C. Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea*
35 *millefolium* and *Bauhinia forficata* *in vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,
36 v.2013, p.1-6, 2013.

- 1 GIORDANI, C. *Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade*
2 *antifúngica frente à Malassezia pachydermatis*. 2013. 26f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade
3 de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- 4
- 5 GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, v.9,
6 p.767-776, 2007.
- 7
- 8 GUTERRES, K. A. *Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos*
9 *e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae*. 2015. 97f. Dissertação (Mestrado
10 em Ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- 11
- 12 JORGE, T.S.; ARROTEIA, K.F.; SANTOS, I.A.; ANDREST, E.; MEDINA, S.P.H.; FERRARI, C.R.;
13 LOURENÇO, C.B.; BIAGGIO, R.M.T.T.; MOREIRA, P.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi extract and
14 linoleic acid from *Passiflora edulis* synergistically decrease melanin synthesis in B16 cells and reconstituted
15 epidermis. *International Journal of Cosmetic Science*, p.1-6, 2012.
- 16
- 17 KOLDAS, S.; DERMITAS, I.; OZEN, T.; DERMICI, M.A.; BEHÇET, L. Phytochemical screening,
18 anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional
19 usage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013.
- 20
- 21 LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e
22 antioxidante. *Revista Fitos*, v.3, n.3, 2007.
- 23
- 24 MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.O.; LOTUFO, L.V.C.; MAGALHÃES, H.I.F.;
25 MORAES, M.O.; LIMA, D.P.; TININIS, A.G.; OLIVEIRA, J.E. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian
26 Middle West plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.21, n.3, p.456-464, 2011.
- 27
- 28 MARRELI, M.; CRISTALDI, B.; MENICHINI, F.; CONFORTI, F. Inibitory effects of wild dietary plants
29 on lipid peroxidation and the proliferation of human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, v.86, p.16-
30 24, 2015.
- 31
- 32 MATSUO, A.L.; FIGUEIREDO, C.R.; ARRUDA, D.C.; PEREIRA, F.V.; SCUTTI, J.A.B.; MASSAOKA,
33 M.H.; TRAVASSOS, L.R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G.. α -Pinene isolated from *Schinus*
34 *terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a
35 melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n.411, p.449-454, 2011.
- 36
- 37

- 1 MEIRELLES, A.E.W.B.; OLIVEIRA, E.C.; RODRIGUES, B.A.; COSTA, G.R.; SONNE, L.; TESSER,
2 E.S.; DRIEMEIER, D. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da Região Metropolitana de Porto
3 Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.11, p.968-973, 2010.
4
- 5 MICELI, N.; BUONGIORNO, L.P.; CELI, M.G.; CACCIOLA, F.; DUGO, P.; DONATO, P; MONDELLO,
6 L.; BONACCORSI, I.; TAVIANO, M.F. Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic
7 activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. *Natural Product Research*, 2015.
8
- 9 MONKS, N.R.; BORDIGNON, A.L.; FERRAZ, A.; MACHADO, K.R.; FARIA, D.H.; LOPES, R.M.;
10 MONDIN, C.A.; SOUZA, I.C.C.; LIMA, M.F.S.; ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-tumour
11 screening of brazilian plants. *Pharmaceutical Biology*, v.40, n.8, p.603-616, 2002.
12
- 13 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunological*
14 *Methods*, v.65, p.55-63, 1983.
15
- 16 NEWMAN, D.J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug
17 discovery? *Journal of Medicinal Chemistry*, v.51, p.2589-2599, 2008.
18
- 19 PRINCIPE, C.R.; SPIRA, B. The effect of sixteen medicinal plants used in the Brazilian pharmacopoeia on
20 the expression and activity of glutathione *S*-transferase in hepatocytes and leukemia cells. *Pharmaceutical*
21 *Biology*, v.47, n.12, p.1192-1197, 2009.
22
- 23 REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with
24 antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. *Forschende*
25 *Komplementärmedizin*, v.16, p.79-90, 2009.
26
- 27 ROLIM, V.M.; CASAGRANDE, R.A.; WATANABE, T.T.; WOUTERS, A.T.; WOUTERS, F.; SONNE,
28 L.; DRIEMEIER, D. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e
29 caracterização imuno-histoquímica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, n.4, p.340-346, 2012.
30
- 31 RUSSO, A.; FORMISANO, C.; RIGANO, D.; CARDILE, V.; ARNOLD, N.A.; SENATORE, F.
32 Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils
33 of three lebanese *Salvia* species. *Industrial Crops and Products*, 2016.
34
- 35 SANTIN, R.; GIORDANI, C.; MADRID, I.; FREITAG, R.A.; MEIRELES, M.C.A.; CLEFF, M.B.;
36 MELLO, J.R.B. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia*
37 *pachydermati*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n.2, v.66, 2014.
38

- 1 SANTOS, K.A.; MATIAS, E.F.F.; TINTINO, S.R.; SOUZA, C.E.S; BRAGA, M.F.B.M.; GUEDES,
2 G.M.M.; ROLÓM, M.; VEJA, C.; ARIAS, A.R.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO,
3 H.D.M.. Anti-*Tripanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Experimental Parasitology*,
4 v.131, p.130-132, 2012.
- 5
- 6 SAVINI, I.; ARNONE, R.; CATANI, M.V. et al. *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon
7 cancer Caco₂ cells. *Nutrition and Cancer*, v.61, n.3, p.381–389, 2009.
- 8
- 9 SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G.A.P.; NACHTIGAL, G.F.; BAUER, M.V.L. Método de preparo de
10 tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. *Comunicado técnico-EMBRAPA*, n.190, 2008.
- 11
- 12 SCHIFFMAN, J.D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about
13 humans with cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v.370, p.1-13, 2015.
- 14
- 15 SHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, M.L.; ALICE, C.B.; AVIGLIANO, L.. Evaluation of some
16 pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v.44, p. 137-142, 1994.
- 17
- 18 SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L.. Estudo retrospectivo de 761 tumores
19 cutâneos em cães. *Ciência Rural*, v.36, n.12, p.555-560, 2006.
- 20
- 21 SUPRIYATI, N.; WAHYUONO, S.; WIDOWAT, E.W. Flow cytometric analysis of MCF-7 cell line in its
22 treatment with leaves extract of *Eugenia uniflora* L. *International Conference on Bioscience and*
23 *Biotechnology Proceeding*, v.1, n.1, p. 79-85, 2011.
- 24
- 25 VICTORIA, F.N.; LENARDÃO, E.J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN G.; JACOB, R.G.; ALVES, D.; SILVA,
26 W.P.; MOTTA, A.S.; NASCENTE, P.S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and
27 antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology*, v.50, p.2668-2674, 2012.
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34

4.3 Artigo 3

Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos em cães

Cristine Cioato da Silva; Thomas Normanton Guim; Cristina Gevehr Fernandes;
Daniele Vitor Barboza; Marlete Brum Cleff

Submetido à revista Clínica Veterinária

Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos em cães

Cristine Cioato da Silva*; Thomas Normanton Guim; Cristina Gevehr Fernandes; Daniele Vitor Barboza; Marlete Brum Cleff

Universidade Federal de Pelotas

*Autor para correspondência: Campus Universitário, s/n° - CEP: 96160-000, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil
E-mail: criscioato@hotmail.com

Resumo

Realizou-se um estudo retrospectivo dos pacientes diagnosticados com melanoma no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas entre os anos de 2011 e 2015, abordando aspectos epidemiológicos, diagnósticos e prognósticos. Todos os dados foram resgatados dos prontuários dos pacientes. Foram identificados 17 cães diagnosticados com melanoma cutâneo, que foram tratados cirurgicamente. A maioria deles eram fêmeas, sem raça definida, com idade média de 10,5 anos e coloração de pele ou mucosa escura. O estadiamento foi realizado em 11 animais e observou-se que os pacientes em estágios mais avançados tiveram pior prognóstico. A excisão cirúrgica foi eficaz em controlar a doença em animais sem metástases. Os cães portadores de tumores pequenos e que não apresentaram metástases no momento do diagnóstico, tiveram sobrevida maior e, portanto, um melhor prognóstico.

Palavras-chave: caninos; tumores cutâneos; cirurgia; fatores prognósticos; sobrevida.

Abstract

We conducted a retrospective study of patients diagnosed with melanoma in the Veterinary Clinical Hospital of the Federal University of Pelotas between the years 2011 and 2015, covering epidemiological, diagnostic and prognostic. All data have been rescued from patient charts. They identified 17 dogs diagnosed with cutaneous melanoma who were treated surgically. Most of them were female mongrel, with a mean age of 10.5 years and coloring of skin or dark mucosa. The staging was performed in 11 animals and observed that patients in advanced stages have the worst prognosis. Surgical excision was effective in controlling the disease in animals without metastases. The dogs with small tumors and who did not have metastases at diagnosis had a higher survival rate and therefore a better prognosis.

Keywords: canines; skin tumors; surgery; prognostic factors; survival.

Resumén

Se realizó un estudio retrospectivo de pacientes con diagnóstico de melanoma en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Federal de Pelotas, entre los años 2011 y 2015, que cubren epidemiológica, diagnóstico y pronóstico. Todos los datos han sido rescatados de las cartas del paciente. Se identificaron 17 perros diagnosticados de melanoma cutáneo que fueron tratados quirúrgicamente. La mayoría de ellos eran mestizo femenino, con una edad media de 10,5 años y la coloración de la piel o la mucosa oscuro. La puesta en escena se realizó en 11 animales y se observó que los pacientes en etapas avanzadas tienen el peor pronóstico. La escisión quirúrgica fue eficaz en el control de la enfermedad en los animales sin metástasis. Los perros con tumores pequeños y que no tenían metástasis al momento del diagnóstico tuvieron una tasa de supervivencia más alta y por lo tanto un mejor pronóstico.

Palabras clave: caninos; tumores de la piel; cirugía; factores pronósticos; supervivencia.

Introdução

Melanomas são neoplasmas formados a partir de células produtoras de melanina, os melanócitos e os melanoblastos¹. São relativamente comuns em cães, principalmente naqueles que apresentam níveis de pigmentação cutânea elevados². Em humanos, o desenvolvimento deste neoplasma geralmente está associado à exposição solar, sendo pouco provável que esta

situação ocorra em animais, no entanto, os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma canino não são bem estabelecidos^{2,3}.

O melanoma tem grande importância na oncologia veterinária por tratar-se de um tumor invasivo e altamente metastático, principalmente quando se localiza nos dígitos e na cavidade oral^{4,5}. A pele hirsuta é o local mais comum de melanomas malignos em cães, porém, podem ocorrer de forma primária na cavidade oral, no leito subungueal, nas junções mucocutâneas, no globo ocular e no trato gastrointestinal⁵.

O comportamento biológico das neoplasias melanocíticas varia amplamente, gerando um desafio diagnóstico e dificuldade no estabelecimento de marcadores prognósticos. Além da localização, também são importantes para a determinação do tratamento e do prognóstico o tamanho do tumor, o estágio da doença e as características histopatológicas^{6,7}.

A ressecção cirúrgica com margens amplas é recomendada e pode ser a única modalidade terapêutica adotada em animais portadores de massas pequenas, pouco invasivas, não aderidas e sem metástases. A quimioterapia e a radioterapia adjuvantes podem ser aplicadas nos pacientes em que foram detectadas metástases e/ou nos quais a ressecção completa não foi possível⁸.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo retrospectivo dos pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, entre os anos de 2011 e 2015, abordando aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e prognósticos.

Metodologia

Os dados foram obtidos dos prontuários clínicos de cães que apresentaram diagnóstico de melanoma, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas no período de setembro de 2011 a dezembro de 2015. Foram coletados dados epidemiológicos como espécie, idade, sexo e raça dos animais; e clínicos, como a localização e tamanho dos tumores, status dos linfonodos regionais, laudos de exames de imagem para detecção de metástases distantes e de exames citológicos pelo método de aspiração com agulha fina. O estadiamento da doença oncológica foi realizado através do sistema de estadiamento para tumores epidermais e dermais de cães e gatos (Figura 1) proposto pela Organização Mundial da Saúde⁹.

Foram ainda coletadas informações do exame histopatológico dos neoplasmas, sobre os tipos de melanomas envolvidos, status das margens cirúrgicas e dos linfonodos regionais. Todas as amostras foram excisadas cirurgicamente, fixadas em formol 10% e avaliadas através de coloração de hematoxilina-eosina. Em dois casos de melanoma do tipo amelanótico utilizou-se a coloração de Fontana Masson para evidenciar os grânulos de melanina intracitoplasmáticos. Quanto ao tipo histológico envolvido, os neoplasmas foram classificados segundo a Classificação Histológica de Tumores Cutâneos em Animais Domésticos proposta pela Organização Mundial da Saúde¹⁰. As margens cirúrgicas foram identificadas com tinta nanquim de cor preta, avaliadas microscopicamente e classificadas em livres ou comprometidas por células neoplásicas.

A sobrevida dos animais foi avaliada em meses, sendo adotado como ponto zero o dia do procedimento cirúrgico. As informações relativas às condições dos animais após a cirurgia foi obtida através dos retornos para avaliação clínica e/ou contato telefônico com os proprietários.

Utilizou-se a estatística descritiva para apresentação dos dados obtidos.

<p>T – Tumor primário T₀: sem evidência de tumor</p> <p>T₁: tumor com diâmetro máximo < 2cm, superficial ou exofítico</p> <p>T₂: tumor com diâmetro máximo 2-5cm ou com invasão mínima dependendo do tamanho</p> <p>T₃: tumor com diâmetro máximo > 5cm, ou com invasão subcutânea, independente do tamanho</p> <p>T₄: invade outras estruturas, como fáscia, músculo, osso, cartilagem.</p>	<p>N – Linfonodos Regionais (LR) N₀: sem evidência de envolvimento de LR</p> <p>N₁: linfonodos ipsilaterais com mobilidade N_{1a}: linfonodos considerados não metastáticos N_{1b}: linfonodos considerados metastáticos</p> <p>N₂: linfonodos contralaterais ou bilaterais com mobilidade. N_{2a}: linfonodos considerados não metastáticos N_{2b}: linfonodos considerados metastáticos</p> <p>N₃: linfonodos fixos (-) histologicamente negativo (+) histologicamente positivo</p>
	<p>M – Metástases distantes M₀: sem evidências de metástases distantes</p> <p>M₁: metástases distantes detectáveis</p>
T ₁ N ₀ M ₀ ; T ₂ N ₀ M ₀	Estágio I
T ₁ N ₀ M ₀ ; T ₂ N ₁ M ₀	Estágio II
T ₁ N _{2,3} M ₀ ; T ₂ N _{2,3} M ₀ ; T ₃ N _{0,1,2,3} M ₀ ; T ₄ N _{0,1,2,3} M ₀	Estágio III
Qualquer T, qualquer N, M ₁	Estágio IV

Figura 1. Sistema de estadiamento para tumores epidermais e dermais de cães e gatos utilizado no estudo, proposto pela Organização Mundial da Saúde⁹.

Resultados e discussão

Durante o período estudado, foram identificados 17 cães com diagnóstico de melanoma. Houve predomínio de fêmeas (n=11) em relação aos machos (n=6). A média de idade dos animais acometidos foi de 10,5 anos, variando entre seis e 15 anos. No presente estudo, apesar do maior número de fêmeas acometidas, a literatura cita um maior número de casos relatados em machos, porém, ainda não foi comprovada a existência de uma predisposição sexual para a ocorrência deste neoplasma⁷. Em relação à faixa etária, é relatado um maior número de diagnósticos em cães adultos e idosos, sendo 10 anos a idade média dos pacientes, dados semelhantes aos encontrados neste estudo^{4,11}.

Em relação à raça dos cães acometidos, sete eram de raça indefinida, seguido por Yorkshire (n=2), Labrador (n=1), Dachshund (n=1), Pastor Alemão (n=1), Collie (n=1), Pointer Inglês (n=1), Cocker Spaniel (n=1), Pitbull (n=1) e Rottweiler (n=1). De acordo com alguns autores, cães das raças Schnauzer, Scotttish terrier e de raças pequenas, especialmente o Poodle e o Cocker Spaniel parecem ter um maior risco de desenvolver melanoma¹². Porém, os cães sem raça definida, e os Dachshunds, Labradores e Golden Retrievers apresentam também uma alta ocorrência da neoplasia¹³⁻¹⁵. Os dados obtidos nesse estudo, somados aos dados da literatura, sugerem que possa haver super-representação de algumas raças em determinadas localidades, o que pode influenciar na incidência da doença sem que exista realmente uma predisposição⁸. Sabe-se, contudo, que independente da raça, há um risco aumentado para o desenvolvimento de melanomas em cães que tenham a pele e/ou as mucosas pigmentadas^{5,12,16}, o que está de acordo com o observado no presente estudo, onde nove animais apresentavam coloração da pele ou mucosa escura, enquanto seis tinham pele ou mucosa clara e em dois cães esse dado não foi resgatado.

Foram identificados 21 tumores localizados em diferentes regiões do corpo (Figura 2). Os tumores distribuíam-se pelas regiões abdominal (n=6), auricular (n=3), cervical (n=2), palpebral (n=2), perilabial (n=2), torácica (n=1), suprapalpebral (n=1), membro posterior (n=1), escrotal (n=1), prepucial (n=1) e digital (n=1). Os melanomas da cavidade oral e lábios são considerados como neoplasmas de comportamento mais agressivo e pior prognóstico, quando

comparados com aqueles localizados na pele^{2,7,14,17}. Dentre os melanomas cutâneos, aqueles localizados nos dígitos parecem apresentar um pior prognóstico⁷. No presente estudo, em três pacientes foram identificados melanomas em regiões consideradas de pior prognóstico pela literatura, sendo dois perilabiais e um digital. Desses animais, apenas um permaneceu vivo até o fim do estudo, o qual apresentava melanoma perilabial, sem presença de metástases. Os dois pacientes mortos, porém, apresentavam metástases nos linfonodos regionais e um apresentava também metástases pulmonares, não sendo possível relacionar o prognóstico somente à localização do tumor primário. Esses resultados estão de acordo com a literatura que aponta a localização anatômica como um fator prognóstico importante, mas que não deve ser o único fator preditivo a ser considerado^{2,7,8}.



Figura 2. Diferentes localizações primárias e linfonodos metastáticos de melanomas cutâneos. A) Tumor primário localizado abaixo do lábio (seta branca) e linfonodo submandibular esquerdo aumentado (seta preta). B) Tumor primário, originado do lábio (seta branca) e linfonodo submandibular esquerdo aumentado (seta preta). C) Melanoma palpebral (seta). D) Melanoma localizado no saco escrotal (seta).

Dos 21 tumores avaliados, houve predomínio de tumores pequenos, < 2 cm (n=13), seguido por tumores entre 2 e 5cm (n=5) e finalmente por tumores > 5cm (n=3). O diâmetro médio dos tumores foi de 3 cm. Tumores maiores estão relacionados a um pior prognóstico, pois apresentam um padrão mais agressivo de comportamento biológico, além de apresentarem ressecção total dificultada, deixando margens pobres ou comprometidas e um maior risco de desenvolver metástases distantes¹⁸. No presente estudo, a média de tamanho dos tumores dos animais que apresentavam metástase regional ou distante no momento do diagnóstico foi de 5 cm e a dos animais livres de metástases foi de 1,71 cm. Os dados apresentados corroboram com outros autores, que observaram uma maior porcentagem de diagnósticos de metástases pulmonares nos cães com tumores macroscópicos (61%) em relação aos microscópicos (34%)¹⁹. Adicionalmente, a literatura também relaciona o aumento de 1cm no tamanho do tumor a um aumento de 32% na recorrência local do tumor ou no surgimento de metástases e 29% na ocorrência de morte¹⁴.

Considerando os casos onde foi possível a avaliação de lesões metastáticas em pulmões ou linfonodo regional no momento do diagnóstico (n=13), foi detectada a presença destas em 53,8% dos animais (n=7) (Figura 3). Dentre esses pacientes, quatro morreram, apresentando sobrevida média de 3,75 meses. Esse resultado está de acordo com a literatura que afirma que a presença de metástases distantes e/ou em linfonodos regionais está

associada com piores prognósticos, independente da localização primária e do tamanho do melanoma⁷. Em um estudo retrospectivo com 19 cães portadores de melanomas cutâneos, foi relatada a presença de metástases em 31,58% dos casos¹¹.

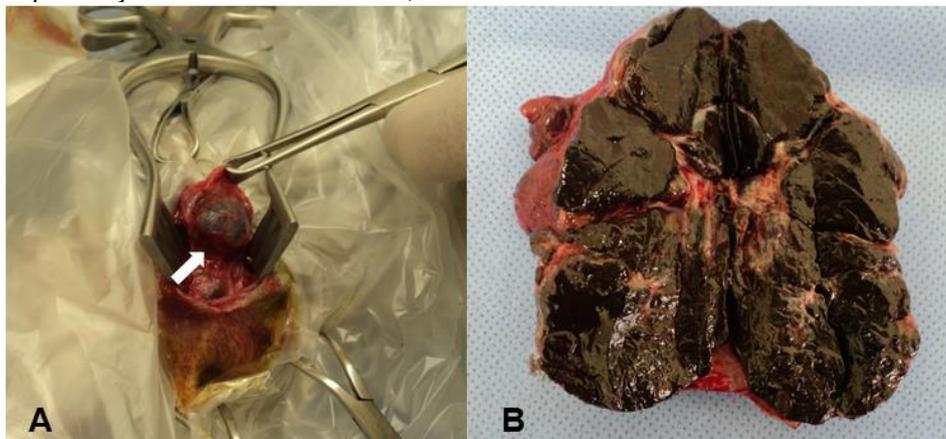


Figura 3. Linfonodos regionais de pacientes com melanoma cutâneo. A) Linfonodo submandibular metastático de paciente com melanoma labial (seta). B) Aspecto macroscópico da superfície de corte de linfonodo metastático, após excisão cirúrgica.

Foi realizado o acompanhamento de 15 pacientes após a cirurgia (Figura 4). Ao fim do estudo, sete desses pacientes estavam mortos (46,7%) com média de sobrevida de 5 meses, com variação de 0 a 15 meses. No entanto, apenas quatro destes pacientes morreram em decorrência de metástases ou outras causas relacionadas ao neoplasma. Dos pacientes vivos (n=8), o tempo médio de sobrevida até a conclusão deste estudo foi de 25,4 meses, com variação de 2 a 51 meses de acompanhamento pós-cirúrgico. Em estudos semelhantes, a maioria dos cães portadores de melanomas cutâneos também permaneceu vivo até o fim do estudo, com sobrevida média variando entre 30 dias e 5 anos e entre os cães mortos, menos da metade morreu em decorrência do tumor ou de suas complicações¹¹.

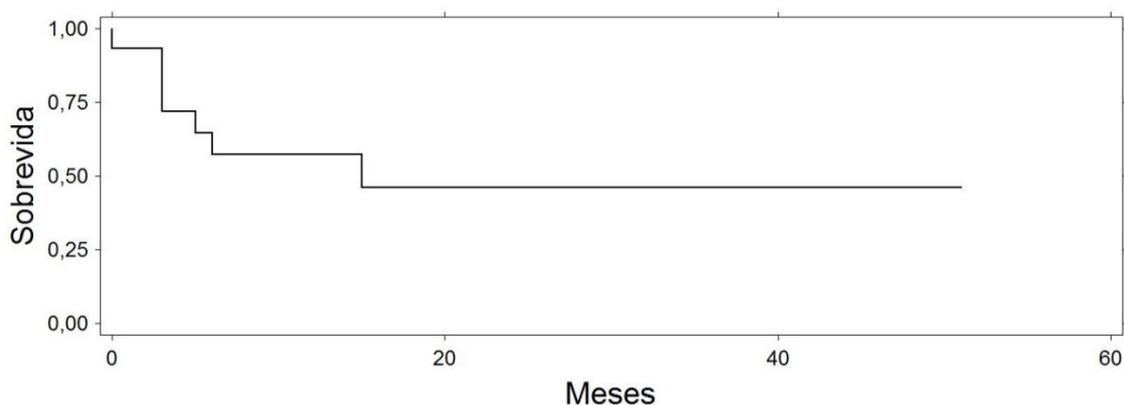


Figura 4. Curva de sobrevida referente aos 15 pacientes nos quais foi realizado o acompanhamento pós-cirúrgico.

O estadiamento foi realizado em 11 animais, onde cinco (45,5%) foram classificados como grau I, um foi classificado como grau II (9,1%), dois como grau III (18,2%) e três como grau IV (27,2%). Os pacientes com estágio IV da doença morreram e apresentaram média de sobrevida de 4 meses, os pacientes com estágio III da doença estão vivos em 12 meses de acompanhamento e os pacientes com estágio I da doença estão vivos, com tempo mínimo de acompanhamento de 3 e máximo de 65 meses. Não foi possível o acompanhamento do paciente que apresentou estágio II da doença. Embora um número pequeno de casos tenha sido acompanhado, estes resultados demonstram que animais com metástases distantes apresentam pior prognóstico em relação aos animais que não apresentam nenhum tipo de

metástase⁷. Outros autores observaram a presença de metástases no momento do diagnóstico de melanoma oral em menos da metade dos pacientes, porém, o tempo de sobrevivência desses pacientes foi muito menor, sendo de 131 dias nos pacientes com metástase e 818 naqueles sem metástase¹².

O exame citológico através de aspiração com agulha fina foi realizado em nove animais. O exame foi inconclusivo em três casos por motivos de material insuficiente ou coleta errônea. Em seis casos foi possível estabelecer um diagnóstico presuntivo. Esses resultados demonstram a importância da realização deste exame, uma vez que consiste em um método rápido para o estabelecimento de um diagnóstico presuntivo do melanoma e de metástases, auxiliando no estabelecimento do tratamento e do prognóstico na maioria dos casos²⁰.

Todos os 21 neoplasmas foram avaliados através da histopatologia. Dois foram do tipo amelanótico, um com padrão epitelióide e outro misto; enquanto os outros 19 apresentaram a forma típica pigmentada, dez com padrão epitelióide, cinco com padrão fusiforme e quatro com padrão misto. No cão, o padrão celular não possui valor prognóstico, no entanto, em felinos o tipo epitelióide apresenta um comportamento mais agressivo e maligno¹. A distinção entre um melanoma amelanótico e outros neoplasmas pobremente diferenciados é um desafio ao patologista, pois muitas vezes a melanina é escassa ou mesmo ausente, podendo ainda ser confundida com outros pigmentos^{4,21}. As técnicas de histoquímica e imunoistoquímica geralmente são utilizadas para confirmar o diagnóstico de melanomas amelanóticos^{4,11}. No presente estudo, nos dois casos de melanoma amelanótico, utilizou-se da coloração de Fontana Masson para evidenciar os grânulos de melanina.

As margens cirúrgicas foram avaliadas em 19 neoplasmas, dos quais 17 apresentaram margens livres e dois apresentaram margens comprometidas por células neoplásicas. De todos os tumores em que as margens foram avaliadas, houve recidiva em apenas um caso, sendo do paciente que apresentou margens comprometidas. Embora seja recomendada a completa excisão cirúrgica para todas as neoplasias melanocíticas, não há estudos suficientes na literatura atual em relação ao valor prognóstico das margens cirúrgicas destes neoplasmas⁷.

Nesse estudo, os 21 tumores identificados foram removidos através de cirurgia e apenas um animal recebeu quimioterapia adjuvante. A cirurgia continua sendo a modalidade terapêutica mais efetiva para melanomas, principalmente para tumores pequenos (< 2 cm), móveis e bem circunscritos e em pacientes que ainda não apresentem metástases^{2,14}. Essa informação corrobora com os resultados apresentados no presente estudo, onde todos os animais em estágio I apresentaram taxas de sobrevivência mais altas em relação aos em estágio IV. Os dois animais que apresentaram somente metástase regional (grau III) sobreviveram durante o período de um ano, demonstrando que a remoção cirúrgica do neoplasma e do linfonodo afetado foi efetiva no controle local da doença, no entanto, os mesmos pacientes não foram avaliados em relação à presença de metástases distantes após o procedimento cirúrgico. A literatura também indica que não há diferença significativa no tempo médio de sobrevivência de cães tratados unicamente com cirurgia em comparação com os que receberam quimioterapia convencional, quimioterapia metronômica ou imunoterapia adjuvantes¹⁸.

Conclusões

Os dados obtidos nesse estudo permitem afirmar que os melanomas cutâneos malignos estão presentes na rotina oncológica do HCV-UFPEL, estando o seu comportamento biológico relacionado principalmente com o tamanho do tumor e a presença de metástases. Foi observada uma maior frequência desse neoplasma em cães adultos e idosos, de pele, pelagem e/ou mucosas enegrecidas, sem predisposição racial ou sexual.

A excisão cirúrgica mostrou-se eficaz em controlar a doença em animais sem lesões metastáticas, mantendo a qualidade de vida dos pacientes. Os cães portadores de tumores pequenos e que não apresentaram metástases no momento do diagnóstico, tiveram sobrevivência maior e, portanto, um melhor prognóstico. Ressalta-se, portanto, a influência do diagnóstico precoce na eficácia do tratamento, na qualidade de vida e na sobrevivência dos pacientes.

Referências Bibliográficas

1. GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Iowa: Iowa State Press, 2002, 788 p.

2. BERGMAN, P.J.; KENT, M.S.; FARESE, J.P. Melanoma. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D. M.; PAGE, R.L. **Withrow & MacEwen's – Small Animal Clinical Oncology**. Missouri: Elsevier, 2013. Cap.19, p.321-331.
3. VAIL, D.M.; MACEWEN, E.G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer Investigation**, v.18, n.8, p.781-792, 2000.
4. ROLIM, V.M.; CASAGRANDE, R.A.; WATANABE, T.T.; WOUTERS, A.T.; WOUTERS, F.; SONNE, L.; DRIEMEIER, D. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imunohistoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.4, p.340-346, 2012.
5. SMITH, S.H.; GOLDSCHMIDT, M.H.; MCMANUS, P.M. A comparative review of melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, n. 39, p.651–678, 2002.
6. RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENHERZ, M.E.; MILLER, M.A.; JOHNSON, G.C.; PACE, L.W.; FARD, A.; KOTTLER, S.J.; Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histological, and immunohistochemical - review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v.37, p. 597-608, 2000.
7. SMEDLEY, R.C.; SPANGLER, W.L.; ESPLIN, D.G.; KITCHELL, B.E.; BERGMAN, P.J.; HO, H.-Y.; BERGIN, I.L.; KIUPEL, M. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary Pathology**. v.48, n.1, p. 54-72, 2011.
8. BERGMAN, P. J. Canine oral melanoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.22, n.2, p.55-60, 2007.
9. OWEN, L.N. TNM Classification of tumours in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, 1980.
10. GOLDSCHMIDT, M.H.; DUNSTAN, R.W.; STANNARD, A.A.; VON TSCHARNER, C.; WALDER, E.J.; YAGER, J.A. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. In: **World Health Organization International Histological Classification of Tumors in Domestic Animals**, 2nd series, v. III, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1998
11. CAMARGO, L.P.; CONCEIÇÃO, L.G.; COSTA, P.R.S. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, n.2, p.138-152, 2008.
12. DOBSON, J.M. Breed-redispositions to cancer in pedigree dogs. **International Scholarly Research Notices: Veterinary Science**, p. 1-23, 2013.
13. MEIRELLES, A. E. W. B.; OLIVEIRA, E. C.; RODRIGUES, B. A. et al. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.968-973, 2010.
14. TUOHY, J. L.; SELMIC, L. E.; WORLEY, D. R. et al. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998–2011). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.245, n.11, 2014.
15. ESPLIN, D.G. Survival of dogs following surgical excision of histologically well differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. **Veterinary Pathology**. v.45, p.889–896, 2008.
16. LIU, W.; BENNETT, M.; HELM, T. Canine melanoma: a comparison with human pigmented epithelioid melanocytoma. **International Journal of Pathology**, v.50, p.1542-1545, 2011.
17. BROCKLEY, L. K.; COOPER, M. A.; BENNETT, P. F. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. **New Zeland Veterinary Journal**, v.61, n.1, p.25-31, 2013.
18. BOSTON, S. E.; LU, X.; CULP, W. T. N. et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.245, n.3, p. 401-407, 2014.
19. PROULX, D. R.; RUSLANDER, D. M.; DODGE, R. K. et al. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.44, n.3, p.352-359, 2003.
20. DOUBROVSKY, A.; SCOLYER, R.A.; MURALI, R.; MCKENZIE, P.R.; GEOFFREY, F.W.; LEE, C.S.; MCLEOD, D.J.; MCCARTHY, W.H.; UREN, R.F.; STRETCH, J.R.; SAW, R.P.; THOMPSON, J.F. Diagnostic accuracy of fine needle biopsy for metastatic

- melanoma and its implications for patient management. **Annals of Surgical Oncology**, v.15, n.1, p.323–332, 2008.
21. SULAIMON, S.S.; KITCHELL, B.E.; EHRHART, E.J. Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, p.162-168, 2002.

5 Considerações Finais

- Todos os extratos vegetais testados apresentaram efeito antiproliferativo nas células de melanoma murino (B16F10)
- Os óleos essenciais de *Origanum majorana* e de *Origanum vulgare* apresentaram alta atividade citotóxica *in vitro* em células de melanoma, e baixa toxicidade em MDBK.
- O óleo essencial *R. officinalis*, apresentou menor atividade citotóxica nas células de melanoma (B16F10) em comparação com os demais óleos essenciais, com toxicidade moderada na linhagem de células renais (MDBK).
- Os compostos majoritários identificados na análise cromatográfica do óleo essencial de *R. Officinalis* foram 1-8 cineol, canfor e α -pinene, do óleo essencial de *O. majorana* foram 4-terpineol, 4-carene e 5-isopropyl-2-methylbicyclo e do óleo essencial de *O. vulgare* foram γ -terpineno, 4-terpineol e hidroxy-p-cymene.
- Os extratos hidroalcoólicos de *B. forficata*, *E. uniflora* e *O. vulgare* em 48 horas, apresentaram atividade citotóxica em células de melanoma, uma vez que atingiram moderada atividade inibitória nas células B16F10 em concentrações com baixa toxicidade para as células normais (MDBK).
- O extrato de *S. terebinthifolius* não exibiu atividade satisfatória nas células tumorais, quando cruzadas as concentrações efetivas (B16F10) e tóxicas (MDBK).
- Os melanomas cutâneos estão presentes na rotina oncológica do HCV e o seu comportamento biológico está relacionado principalmente com o tamanho do tumor e a presença de metástases.

Referências

ABDEL-MASSIH, R. M.; FARES, R.; BAZZI, S. et al. The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. **Leukemia Research**, v.34, p. 1052-1056, 2010.

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavor and Fragrance Journal**, v.25, p.407-426, 2010.

AGRA M.F., FRANÇA P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, p.114-140, 2007.

AL-KALALDEH, J. Z.; ABU-DAHAB, R; AFIFI, F. U. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. **Nutrition Research**, v.30, p.271-278, 2010.

ARAÚJO, E. C.; OLIVEIRA, R. A. G.; CORIOLANO, A. T. et al. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública em João Pessoa (PB). **Revista Espaço para a Saúde**, v.8, n.2, p.44-52, 2007.

BAGETTI, M. *Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (Eugenia unifora L.)*. 84f.2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Santa Maria, 2009.

BAILÃO, E. F. L. C.; DEVILLA, I. A.; CONCEIÇÃO, E. C. et al. Bioactive compounds found in brazilian cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p.23760-23783, 2015.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BARABAS, K.; MILNER, R.; LURIE, D. et al. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.6, n.1, p.-18, 2008.

BARROS, T. M. V.; REPETTI, S. F. C. Quimioterapia metronômica em cães: revisão de literatura. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.110, p.49-53, 2015.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M D. et al. Teste in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

BEGNINI, K. R.; NEDEL, F.; LUND, R. G. et al. Composition and antiproliferative effect of essential oil of *Origanum vulgare* against tumor cell lines. **Journal of Medicinal Food**, v.17, n.10, p.1129-1133, 2014.

BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P. et al. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, v.75, n.6, 2010.

BERGMAN, P. J. Canine oral melanoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.22, n.2, p.55-60, 2007.

BERGMAN, P. J.; KENT, M. S.; FARESE, J. P. Melanoma. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. **Withrow & MacEwen's – Small Animal Clinical Oncology**. Missouri: Elsevier, 2013. Cap.19, p.321-331.

BERRINGTON, D.; LALL, N. Anticancer activity of certain herbs and spices on the cervical epithelial carcinoma (HeLa) cell line. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.1-11, 2012.

BEZERRA, N. A.; FELISMINO, D. C.; CHAVES, T. P.; ALENCAR, L. C. B.; DANTAS, I. C.; SOBRINHA, L. C. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Eugenia uniflora* L. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.8, n.2, p.40-48, 2012.

BLANK, D. **Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família Lamiaceae**. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Química, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BONES, V. C.; MOLETO, C. F. M. Alternativas ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em Foco**, v.10, n.1, p.103-112, 2012.

BOSTON, S. E.; LU, X.; CULP, W. T. N. et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–

2012). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.245, n.3, p. 401-407, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2011. 126p.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n.1, p.229-239, 2010.

BREHMER, J. S. *Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich*. 2005. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

BROCKLEY, L. K.; COOPER, M. A.; BENNETT, P. F. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. **New Zeland Veterinay Journal**, v.61, n.1, p.25-31, 2013.

CABELLO, M. L. R.; PRAENA, D. G.; PICHARDO, S. et al., Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. **Food and Chemical Toxicology**, v.64, p.281–290, 2014.

CAMARGO, L.P.; CONCEIÇÃO, L.G.; COSTA, P.R.S. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.45, n.2, p.138-152, 2008.

CARVALHO, M. G.; MELO, A. G. N.; ARAGAO, C. F. S. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, 2013.

CATTANEO, L.; CICCONE, R.; MIGNOGNA, G.; et al. Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. **PLOS ONE**, p.1-18, 2015.

CHUN, K-S., KUNDU, J.; CHAE, I. G. et al. Carnosol: a phenolic diterpene with cancer chemopreventive potential. **Journal of Cancer Prevention**, v.19, n.2, p.103-110, 2014.

CLEFF, M. B. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária, com ênfase em**

Candida spp. 2008. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

CUNHA, S. C. S.; HOLGUIN, P. G.; CORGOZINHO, K. B. et al. A radioterapia como terapia adjuvante no tratamento do melanoma oral em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41(Sppl.1), n.6, 2013.

DANK, G.; RASSNICK, K. M.; SOKOLOVSKY, Y. et al. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.12, n.1, p. 78-84, 2012.

DI STASI, L. C. Arte, ciência e magia. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. (eds), **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**, Unesp, São Paulo, p. 15-21, 1996.

DOBSON, J. N. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. **International Scholarly Research Notices: Veterinary Science**, p.1-23, 2013.

DOUBROVSKY, A.; SCOLYER, R.A.; MURALI, R.; MCKENZIE, P.R.; GEOFFREY, F.W.; LEE, C.S.; MCLEOD, D.J.; MCCARTHY, W.H.; UREN, R.F.; STRETCH, J.R.; SAW, R.P.; THOMPSON, J.F. Diagnostic accuracy of fine needle biopsy for metastatic melanoma and its implications for patient management. **Annals of Surgical Oncology**. v.15, n.1, p.323–332, 2008.

DUSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; COELHO, A. C. Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* *in vivo*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-6, 2013.

EHRHART, E. J.; KAMSTOCK, D. A.; POWERS, B. E. The pathology of neoplasia. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D. M.; PAGE, R.L. **Withrow & MacEwen's – Small Animal Clinical Oncology**. Missouri: Elsevier, 2013. Cap.3, p.51-67.

ELANSARY, H. O.; MAHMOUD, E. Egyptian herbal tea infusions antioxidantes and their antiproliferative and cytotoxic activities cancer cells. **Natural Product Research**, 2014.

ELMSLIE, R. E.; GLAWE, P.; DOW, S. W. Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.28, p.1373-1379, 2008.

ERDOGAN, A.; OZKAN, A. A comparative study of cytotoxic, membrane and DNA damaging effects of *Origanum majorana*'s essential oil and its oxygenated monoterpene component linalool on parental and epirubicin-resistant H1299 cells. **Biologia**, v.68, n.4, p.754—761, 2013.

ESPLIN, D. G. Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. **Veterinary Pathology**, v.45, p.889-896, 2008.

ESTEVIÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; SIMÕES, R. S. et al. Mast cell concentration and skin wound contraction in rats treated with Brazilian pepper essential oil (*Schinus terebinthifolius Raddi*). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.30, n.4, p.289-295, 2015.

Farmacopéia Brasileira IV – Parte I; 4ª ed., Atheneu: São Paulo; 1988.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J. et al. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoides profile: Relation with their biological properties. **Food Chemistry**, v.134, p.894-904, 2012.

FILHO, V. C. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research**, v.23, p.1347–1354, 2009.

FREEMAN, K. P.; HAHN, K. A.; HARRIS, F. D. et al. Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.17, p. 96-101, 2004.

GIORDANI, C. **Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente à *Malassezia pachydermatis***. 2013. 126f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Iowa: Iowa State Press, 2002, 788 p.

GOLSDSCHMIDT, M.H.; DUNSTAN, R.W.; STANNARD, A.A.; VON TSCHARNER, C.; WALDER, E.J.; YAGER, J.A. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. In: **World Health Organization International Histological Classification of Tumors in Domestic Animals**, 2nd series, v. III, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1998

GONÇALVES, A. L.; FILHO, A. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v.9, p.767-776, 2007.

GRBOVIC, F.; STANKOVIC, M. S.; CURCIC, M. et al. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. **Plants**, v.2, p. 371-378, 2013.

GREATTI, V. R.; NEVES, F. T. A.; CORAL, D. J. et al. Avaliação da atividade antibacteriana "*in vitro*" da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e da canela (*Cinnamomum zeylanicum*) frente a linhagens Gram positivas e Gram negativas. **SALUSVITA**, n.3, v.33, p.345-354, 2014.

GRONDONA, E.; GATTI, G.; LÓPEZ, A. G. et al. Bio-efficacy of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* Lamiaceae. Ssp. *Hirtum*). **Plant Food and Human Nutrition**, 2014.

GROSENBAUGH, D. A.; LEARD, A. T.; BERGMAN, P. J. et al. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, n.12, 2011.

GUTERRES, K. A. **Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae**. 2015. 97f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

HAHN, K. A.; DENICOLA, D. B.; RICHARDSON, R. D. et al. Canine oral malignant melanoma: prognostic utility of an alternative staging system. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p.251-256, 1994.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.

HANAHAN, D.; BERGERS, G.; BERGSLAND, E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.105, n.8, p.1045-1047, 2000.

HAUCK, M. I. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D. M.; PAGE, R.L. **Withrow & MacEwen's – Small Animal Clinical Oncology**. Missouri: Elsevier, 2013. Cap.19, p.305-320.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; CHATHA, S. A. S. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidante and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.1070-1078, 2010.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; RASHEED, S. et al. Composition, antioxidante and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.6, p.943-952, 2011.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde – Brasil. Disponível em: <
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2>> Acesso em 16/09/2015.

INDIANARA, C. E. et. al. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2, p. 258-264, 2008.

JORGE, T. S.; ARROTEIA, K. F.; SANTOS, I. A. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi extract and linoleic acid from *Passiflora edulis* synergistically decrease melanin synthesis in B16 cells and reconstituted epidermis. **International Journal of Cosmetic Science**, p.1-6, 2012.

KAWABE, M.; MORI, T.; ITO, Y. et al. The outcomes of dogs undergoing radiotherapy for treatment of oral malignant melanoma: 11 cases (2006-2012). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.247, n.10, p.1157-1153, 2015.

KOLDAS, S.; DERMITAS, I.; OZEN, T. et al. Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013.

KONTOGIANNI, V. G.; TOMIC, G.; NIKOLIC, I. et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. **Food Chemistry**, v.136, p.120-129, 2013.

LIAO, J. C.; GREGOR, P.; WOLCHOK, J. D. et al. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. **Cancer Immunity**, v.6, n.8, p.1-17, 2006.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v.3, n.3, 2007.

LIU, W.; BENNETT, M.; HELM, T. Canine melanoma: a comparison with human pigmented epithelioid melanocytoma. **International Journal of Pathology**, v.50, p.1542-1545, 2011.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F. et al. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against *in vitro* human tumor models. **Anticancer Research**, v.27, p.3291-3300, 2007.

LOPEZ, R. E. S. *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Fitos**, v.9, n.3, 2015. Disponível em: http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/247/html_3 Acesso em: 11/01/2016.

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. O. et al. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.3, p.456-464, 2011.

MANLEY, C A.; LEIBMAN, N. F.; WOLCHOK, J. D. et al. Xenogeneic murine tyrosinase dna vaccine for malignant melanoma of the digit of dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p.94-99, 2011.

MARCHETTI, V. M.; GIORGI, M.; FIORAVANTI, A. et al. First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study. **Investigational New Drugs**, v. 30, n.4, p.1725-1730, 2012.

MARINHO, M. L.; ALVES, M. S.; RODRIGUES, M. L. C. et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

MARRELI, M.; CRISTALDI, B.; MENICHINI, F. et al. Inibitory effects of wild dietary plants on lipid peroxidation and the proliferation of human cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.86, p.16-24, 2015.

MARTIN, P. D.; ARGYLE, D. J. Advances in the management of skin cancer. **Veterinary Dermatology**, v.24, p. 173-180, 2013.

MATOS, C. B.. **Eficácia de extratos vegetais na desinfecção de superfícies contaminadas com fungos do complexo *Sporothrix***. 83f. 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

MATOS, Francisco J. A. **Farmácias Vivas**. 2.ed. EUFC: Fortaleza, 1997. 179p.

MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C. et al. α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n.411, p.449-454, 2011.

MEIRELLES, A. E. W. B.; OLIVEIRA, E. C.; RODRIGUES, B. A. et al. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.11, p.968-973, 2010.

MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S. et al. Hypoglycemic activity of two Brazilian Bauhinia species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.8-13, 2007.

MICELI, N.; BUONGIORNO, L. P.; CELI, M. G. et al. Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link. (Fabaceae) leaves extract. **Natural Product Research**, 2015.

MITROPOULOU, G.; FITSIOU, E.; STAVROPOULOU, E. Composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative activity of *Origanum dictamnus* (dittany) essential oil. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v.26, 2015.

MONKS, N. R.; BORDIGNON, A. L.; FERRAZ, A. et al. Anti-tumour screening of brazilian plants. **Pharmaceutical Biology**, v.40, n.8, p.603-616, 2002.

MORALES, Marcelo M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v.60, n.2, p.33-36, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p.55-63, 1983.

MOTHANA, R. A. A.; KRIEGISCH, S.; HARMS, M. et al. Assessment of selected Yemeni medicinal plants for their *in vitro* antimicrobial, anticâncer, and antioxidante activities. **Pharmaceutical Biology**, v.49, n.2, p.200-210, 2011.

MURPHY, S.; HAYES, A. M.; BLACKWOOD, L. et al. Oral malignant melanoma: the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.3, n.4, p.222-229, 2005.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, p.2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years 12 over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, p.311-335, 2012.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v.15, p.147-152, 2005.

OLIVEIRA, P. F.; ALVES, J. M.; DAMASCENO, J. L. et al. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.25, p.183-188, 2015.

OTTNOD, J. M.; SMEDLEY, R. C.; WALSHAW, R. et al. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjuvant treatment of canine oral malignant melanoma. **Veterinary Comparative Oncology**, v.11, n.3, 2013.

OWEN, L.N. TNM Classification of tumours in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, 1980.

OZKAN, A.; ERDOGAN, A. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. **Turkish Journal of Biology**, v.35, p.735–742, 2011.

PEPATO, M. T.; BAVIEIRA, A. M.; VENDRAMINI, R. C. et al. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v.4, n.7, p.1-7, 2004.

PEREIRA, D. M. S. et al. Indução e caracterização morfológica e bioquímica de calos de *Hyptis leucocephala* (Lamiaceae) Sitientibus série. **Ciências Biológicas**, v.12, n.1, p. 151–156. 2012.

PEREIRA, E. M. R.; GOMES, R. T.; FREIRE, N. R et al. *In vitro* antimicrobial activity of brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. **Planta Medica**, n.77, p.401-404, 2011.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p.193-210, 2001.

PRINCIPE, C. R.; SPIRA, B. The effect of sixteen medicinal plants used in the Brazilian pharmacopoeia on the expression and activity of glutathione S-transferase in hepatocytes and leukemia cells. **Pharmaceutical Biology**, v.47, n.12, p.1192–1197, 2009.

PROULX, D. R.; RUSLANDER, D. M.; DODGE, R. K. et al. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.44, n.3, p.352-359, 2003.

QUEIRES, L. C. S.; FAUVEL-LAFEVE, F.; TERRY, S. et al. Polyphenols purified from the brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer Research**, v.26, p.379-388, 2006.

RAMOS-VARA, J. A.; BEISSENHERZ, M. E.; MILLER, M. A. et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v.37, p.597-608, 2000.

RAO, S.; TIMSINA, B.; NADUMANE, V. K. et al. Evaluation of the anticancer potentials of *Origanum marjorana* on fibrosarcoma (HT-1080) cell line. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.4 (Suppl.1), p.389-394, 2014.

REED, S. D.; FULMER, A.; BUCKHOLZ, J. et al. Bleomycin/interleukin-12 electrochemogenetherapy for treating naturally occurring spontaneous neoplasms in dogs. **Cancer Gene Therapy**, v.17, p.571-578, 2010.

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U. et al. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. **Forschende Komplementärmedizin**, v.16, p.79-90, 2009.

RODIGHERI, S. M.; DE NARDI, A. B. Quimioterapia metronômica em cães e gatos-revisão de literatura. **Clinica Veterinaria**, v.105, p.40-48, 2013.

ROLIM, V. M.; CASAGRANDE, R. A.; WATANABE, T. T. et al. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.4, p.340-346, 2012.

ROMERO, A. L. et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, 2012.

RUSSO, A.; FORMISANO, C.; RIGANO, D. et al. Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three lebanese *Salvia* species. **Industrial Crops and Products**, 2016.

RUSSO, R.; CORASANITI, M. T.; BAGETTA, G. et al. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1-9, 2015.

SANTIN, R. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.2, p.367-373, 2014.

SANTIN, R. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 104f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013.

SANTOS, K. A.; MATIAS, E. F. F.; TINTINO, S. R. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v.131, p.130-132, 2012.

SATOOKA, H.; KUBO, I. Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.60, p.2746-2752, 2012.

SAVINI, I.; ARNONE, R.; CATANI, M.V. et al. *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon cancer Caco₂ cells. **Nutrition and Cancer**, v.61, n.3, p.381–389, 2009.
SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.370, p.1-13, 2015.

SCHULTHEISS, P. C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. **Journal of Veterinary Investigation**, v.18, p.422- 425, 2006.

SHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, M. L.; ALICE, C. B. et al. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, p. 137-142, 1994.

SILVA, J. G.; FARIA, M. T.; OLIVEIRA, É. R. et al. Chemotaxonomic significance of volatile constituents in *Hyptenia* (Mart. ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, n.5, p.955-960, 2011.

SILVA, K. L.; FILHO, V. C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 449-454, 2002.

SILVA, M. C. C.; DE PAULA, C. A. A.; FERREIRA, J. G. et al *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF-7 human breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, p. 2262–2271, 2014.

SILVA, M. G. F. **Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjericão (*Ocimum basilicum* L.).** 2011. 70f. Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química, 2011.

SILVEIRA, F. S.; MIOTTO, S. T. S. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, p. 93-114, 2013.

SILVEIRA, L. M. G.; BRUNNER, C. H. M.; CUNHA, F. M. et al. Utilização de eletroquimioterapia em neoplasias de origem epitelial ou mesenquimal localizadas em pele ou mucosas de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.47, n.1, p.55-66, 2010.

SIMÕES, R. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico de *Bauhinia forficata* (Fabaceae). **Biota Amazônia**, v.5, n.1, p.27-31, 2015.

SMEDLEY, R. C.; SPANGLER, W. L.; ESPLIN, D. G. et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p.54-72, 2011.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A comparative review of melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v.39, p.651-678, 2002.

SOLOWEY, E.; LICHTENSTEIN, M.; SALLON, S. et al. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. **Scientific World Journal**, 2014.

SOUZA, N. A. B. *Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos*. 2010. 150f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F. et al. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v.36, n.12, p.555-560, 2006.

SPANGLER, W. L.; KASS, P. H. The histologic and epidemiologic bases of prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. **Veterinary Pathology**, v.43, p.136-149, 2006.

SPUGNINI, E. P.; FANCIULLI, M.; CITRO, G. et al. Preclinical models in electrochemotherapy: the role of veterinary patients. **Future Oncology**, v.8, n.7, p.829-837, 2012.

SULAIMON, S.S.; KITCHELL, B.E.; EHRHART, E.J. Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, p.162-168, 2002.

SUPRIYATI, N.; WAHYUONO, S.; WIDOWAT, E. W. Flow cytometric analysis of MCF-7 cell line in its treatment with leaves extract of *Eugenia uniflora* L. **International Conference on Bioscience and Biotechnology Proceeding**, v.1, n.1, p. 79-85, 2011.

TAI, J.; CHEUNG, S.; WU, M. et al. Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on ovarian human cancer cells *in vitro*. **Phytomedicine**, v.19, p.436-443, 2012.

TUOHY, J. L.; SELMIC, L. E.; WORLEY, D. R. et al. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998–2011). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.245, n.11, 2014.

VAIL, D.M.; MACEWEN, E.G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer Investigation**, v.18, n.8, p.781-792, 2000.

VASKO, L., VASKOVA, J., FERJEKACOVA, A. et al. Comparison of some antioxidant properties of plants extrats from *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Eleutherococcus senticosus* and *Stevia rebaudiana*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v.50, n.7, p.614-622, 2014.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. Sinopse de Bauhinia sect. Pauletia (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.3, p.477-491, 2005.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L. et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.2668-2674, 2012.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. Why Worry About Cancer in Companion Animals? In.: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. United States of America: Saunders, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Are the number of cancer cases increasing or decreasing in the world? Ask the expert. Abril, 2008. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>> Acesso em 16/09/2015.

YESIL-CELIK TAS, O.; SEVIMLI, C.; BEDIR, E. et al. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.65, p.158–163, 2010.