

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



Dissertação

**Determinação da atividade citotóxica *in vitro* de compostos fitoquímicos e associações em células MDBK e de melanoma (B16F10)**

**Helena Piúma Gonçalves**

Pelotas, 2019

**Helena Piúma Gonçalves**

**Determinação da atividade citotóxica *in vitro* de compostos fitoquímicos e associações em células MDBK e de melanoma (B16F10)**

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  
Coorientador: Silvia de Oliveira Hübner

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

G635 Gonçalves, Helena Piúma

Determinação da atividade citotóxica in vitro de compostos fitoquímicos e associações em células MDBK e de melanoma (B16F10) / Helena Piúma Gonçalves ; Marlete Brum Cleff, orientadora ; Silvia de Oliveira Hubner, coorientadora. — Pelotas, 2019.

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Ácido cafeico. 2. Ácido p-cumárico. 3. Eucaliptol. 4. Gama terpineno. 5. Quercetina. I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Hubner, Silvia de Oliveira, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Helena Piúma Gonçalves

Determinação da atividade citotóxica *in vitro* de compostos fitoquímicos e associações em células MDBK e de melanoma (B16F10)

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: 28/02/2019

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlete Brum Cleff (Orientador)  
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

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Gevehr Fernandes  
Doutora em Patologia pela Universidade Estadual Paulista

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Giordani  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

**Aos meus pais, meu porto seguro, minha razão de ser.  
Aos animais, que me ensinaram sobre o amor, e despertam o melhor de mim.**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por conceder-me tantas realizações nesta existência, permitindo-me errar, aprender e evoluir.

Dedico esta conquista à minha família, razão da minha existência e a quem eu tributo todas as minhas conquistas. Obrigada pelo incentivo, apoio, amor e carinho.

Ao meu namorado Pedro, companheiro desta jornada, em que vivenciamos vários desafios, apoiando um ao outro. Obrigada pela participação ativa no meu trabalho.

Agradeço à minha orientadora, professora Marlete, pela oportunidade, pelo entusiasmo e apoio. Mais que uma orientadora, um exemplo de ser humano e profissional.

Às minhas queridas colegas Carol, Ceres, Cris, Karina e Sol, obrigada pelo acolhimento, pela companhia e amizade. Com vocês tudo fica mais leve!

Agradeço aos colegas Cris Cioato e Tony Picoli, pela paciência e pelos ensinamentos que nortearam o meu experimento.

Agradeço a toda equipe do LabVir (Laboratório de Virologia) da UFPel, pela colaboração em meu projeto, em especial à minha co-orientadora, professora Silvia Hübner, e ao Zeca.

Ao professor Fábio Bruhm, pela realização da análise estatística deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), aos demais órgãos financiadores CNPq e FAPERGS, ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária e à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.

## Resumo

GONÇALVES, Helena Piúma. **Determinação da atividade citotóxica *in vitro* de compostos fitoquímicos e associações em células MDBK e de melanoma (B16F10)**. 2019. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Os produtos naturais são considerados promissores agentes para prevenção e tratamento do câncer. O melanoma evidencia-se pela alta malignidade e potencial metastático, sendo a quimioterapia a principal modalidade de tratamento, porém, ocasiona citotoxicidade e efeitos deletérios ao organismo. Estas adversidades impulsionam a pesquisa por tratamentos alternativos para o melanoma, com eficácia e segurança. Neste âmbito, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos compostos fenólicos (ácido cafeico e ácido p-cumárico), terpênicos (eucaliptol e gama terpineno) e flavonoide (quercetina), em células neoplásicas de melanoma murino (B16F10) e células de linhagem de rim bovino (MDBK), além de avaliar as associações entre estes e a carboplatina. Os compostos fitoquímicos foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich®), sendo testados nas concentrações de 3 a 0,02 mg.mL<sup>-1</sup>. Após diluição em meio de cultivo celular e DMSO 0,5%, os compostos e carboplatina foram distribuídos em placas de 96 poços, sobre as células B16F10 e MDBK, que foram incubadas por 24 horas, a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT e a leitura por espectrofotômetro (540nm). Todos os compostos apresentaram efeito citotóxico para as células de melanoma, variando entre alta e moderada citotoxicidade. Em relação às células MDBK, os compostos apresentaram toxicidade baixa a moderada. A toxicidade dos compostos para as células B16F10 foi maior do que para as células MDBK. Considerando as médias de todas as concentrações testadas, a quercetina apresentou alta toxicidade para B16F10, e baixa toxicidade para as células MDBK. Os compostos ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol e gama terpineno apresentaram baixa toxicidade para MDBK e moderada toxicidade para B16F10. Quanto às associações entre os compostos e carboplatina, os níveis de toxicidade variaram em função das concentrações testadas. Carboplatina (1 mg.mL<sup>-1</sup>) apresentou baixa toxicidade para as células de melanoma, enquanto que as associações de carboplatina com ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol, gama terpineno e quercetina (1 mg.mL<sup>-1</sup>) promoveram aumento na toxicidade para B16F10. Conclui-se que os compostos ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol, gama terpineno e quercetina apresentam atividade citotóxica em B16F10, e as associações dos compostos com carboplatina incrementaram a atividade deste quimioterápico. Portanto, estes compostos são promissores para a sequência de pesquisas.

**Palavras-chave:** ácido cafeico; ácido p-cumárico; eucaliptol; gama terpineno; quercetina

## Abstract

GONÇALVES, Helena Piúma. **Determination of the *in vitro* cytotoxic activity of phytochemical compounds and associations in MDBK and melanoma cells (B16F10)**. 2019. 71 p. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Natural products are considered promising agents for cancer prevention and treatment. Melanoma is evidenced by the high malignancy and metastatic potential, being that chemotherapy is the main treatment modality, however, it promotes cytotoxicity and deleterious effects to the organism. These adversities drive research into alternative treatments for treatment of melanoma, effectively and safely. In this context, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity of phenolic compounds (caffeic acid and p-coumaric acid), terpenes (eucalyptol and gamma terpinene) and flavonoid (quercetin) in murine melanoma (B16F10) and bovine kidney cells (MDBK), in addition to evaluating the associations between these and carboplatin. Phytochemicals were obtained commercially (Sigma-Aldrich®) and were tested at concentrations of 3 to 0.02 mg.mL<sup>-1</sup>. After dilution in cell culture medium and 0.5% DMSO, the compounds and carboplatin were distributed in 96-well plates on the B16F10 and MDBK cells, which were incubated for 24 hours at 37°C with humid atmosphere and 5% of CO<sub>2</sub>. Cell viability was assessed by MTT assay and spectrophotometer reading (540nm). All compounds showed a cytotoxic effect on melanoma cells, ranging from high to moderate cytotoxicity. Regarding cytotoxicity in MDBK, the compounds showed low to moderate levels of toxicity. The toxicity of the compounds to B16F10 cells was greater than for MDBK cells. Considering the averages of all concentrations tested, the quercetin compound showed high toxicity to B16F10 cells, and low to MDBK cells. The compounds caffeic acid, p-coumaric acid, eucalyptol and gamma terpinene showed low toxicity to MDBK and moderate toxicity to B16F10 cells. Regarding the associations between the compounds and carboplatin, the levels of toxicity varied according to the concentrations tested, and their activities were dose-dependent. Carboplatin (1 mg.mL<sup>-1</sup>) had low toxicity to melanoma cells, whereas carboplatin (1 mg.mL<sup>-1</sup>) was associated with caffeic acid, p-coumaric acid, eucalyptol, gamma terpinene and quercetin in 1 mg. mL<sup>-1</sup>, all promoted increased cellular toxicity to B16F10. Thus, it is concluded that the compounds caffeic acid, p-coumaric acid, eucalyptol, gamma terpinene and quercetin have antiproliferative activity in B16F10, and the associations of the compounds with carboplatin increased the antiproliferative activity of this chemotherapeutic in neoplastic cells. Therefore, these compounds are promising for the sequence of researches with interest in molecules with antineoplastic activity.

**Keywords:** caffeic acid; eucalyptol; gamma terpinene; p-coumaric acid; quercetin



## Lista de Figuras

### **Artigo 1 Cytotoxic activity *in vitro* of phytochemical compounds in B16F10 melanoma cells and MDBK**

- Figura 1 Graphical demonstration of cytotoxic activity of different concentrations of phytochemical compounds (3 to 0.02 mg.mL<sup>-1</sup>) and carboplatin (1 to 0.07 mg.mL<sup>-1</sup>) in B16F10 melanoma cells..... 40
- Figura 2 Graphical demonstration of cytotoxic activity of different concentrations of phytochemical compounds in bovine kidney MDBK cells..... 40
- Figura 3 Graphical demonstration of viability of B16F10 and MDBK cells after treatments with caffeic acid, p-coumaric acid, quercetin, eucalyptol and gamma terpinene in different concentrations..... 41

### **Artigo 2 Efeito citotóxico da associação entre quimioterápico e compostos fitoquímicos em células de melanoma**

- Figura 1 Fórmula estrutural dos compostos fitoquímicos adquiridos comercialmente, testados de forma associada à carboplatina em células B16F10..... 48
- Figura 2 Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto eucaliptol e da associação entre a carboplatina e eucaliptol, a partir de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, em células de melanoma B16F10..... 48
- Figura 3 Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto gama terpineno e da associação entre a carboplatina e gama terpineno, a partir de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, em células de melanoma B16F10..... 49

Figura 4	Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto ácido cafeico e da associação entre a carboplatina e ácido cafeico, a partir de 1 mg.mL <sup>-1</sup> , em células de melanoma B16F10.....	49
Figura 5	Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto ácido p-cumárico e da associação entre a carboplatina e ácido p-cumárico, a partir de 1 mg.mL <sup>-1</sup> , em células de melanoma B16F10.....	50
Figura 6	Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto quercetina e da associação entre a carboplatina e quercetina, a partir de 1 mg.mL <sup>-1</sup> , em células de melanoma B16F10.....	50

## Lista de Tabelas

<b>Artigo 1</b>	<b>Cytotoxic activity <i>in vitro</i> of phytochemical compounds in B16F10 melanoma cells and MDBK</b>	
Tabela 1	Values for CC50 of the compounds (cytotoxic concentration to 50% of cells) of MDBK cells and neoplastic cells (B16F10), and the selectivity index of the compounds.....	32
Tabela 2	Description of the commercially acquired compounds and chemotherapeutics and the concentrations used in the <i>in vitro</i> experiment on B16F10 and MDBK cells.....	34

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>3 Revisão de Literatura.....</b>	<b>14</b>
<b>4 Artigos.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Artigo 1 (Atividade citotóxica <i>in vitro</i> de compostos fitoquímicos em células de melanoma B16F10 e em MDBK) .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Artigo 2 (Efeito citotóxico da associação entre quimioterápico e compostos fitoquímicos em células de melanoma) .....</b>	<b>42</b>
<b>5 Considerações Finais.....</b>	<b>59</b>
<b>Referências.....</b>	<b>60</b>

## 1 Introdução

O uso de produtos naturais, tanto em terapias tradicionais como nas contemporâneas, é muito documentado devido às suas propriedades terapêuticas e baixa toxicidade tecidual (SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2019; VIANA et al., 2017). A pesquisa com plantas e seus derivados vem revelando muitas moléculas promissoras, que interferem no crescimento e progressão do câncer (CRAGG & NEWMAN, 2019). Devido à imperiosa necessidade de empenhar-se na prevenção do câncer, buscam-se agentes que interfiram na evolução do processo de carcinogênese, de forma a reduzir a adesão e migração de células neoplásicas, que são processos iniciais envolvidos na disseminação tumoral (BOUZAIENE et al., 2015). Os compostos fitoquímicos têm méritos como agentes quimioterápicos devido ao seu efeito antiproliferativo nas células neoplásicas e às baixas toxicidades em células normais (SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2019).

Extratos e óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae vem demonstrando ser fonte de compostos de interesse farmacológico, por apresentarem substâncias com atividades antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antiparasitária (CAPELA, 2017; CLEFF et al., 2010; GIORDANI 2017; GUTERRES, 2015; WALLER et al., 2017), e também efeito citotóxico em linhagens celulares neoplásicas, incluindo os melanomas (ELANSARY & MAHMOUD, 2015; MOORE et al., 2016; PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2018; RUSSO et al., 2009; SILVA, 2016).

Os fitoquímicos são compostos originários das plantas, e constituem uma heterogênea classe com propriedades biológicas diversas, e fazem-se pertinentes para a terapia oncológica (RUSSO et al., 2014). Estes compostos isolados possuem atividade antitumoral relatada por diversos autores (BOUZAIENE et al., 2015; CHUNG et al., 2004; SAMPATH et al., 2018; SHAILASREE et al., 2015; SOBRAL et al., 2014), inclusive em células de melanoma (ASANOVA et al., 2003; FERRAZ et al., 2013; SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2019).

Constata-se uma preocupação acerca da elevada incidência de câncer em humanos e animais e o grandioso impacto mundial decorrente dessa doença. Os dados ainda não estão bem determinados, mas os índices de câncer em animais de estimação são semelhantes à ocorrência em seres humanos, e acredita-se que pelo menos metade das mortes de animais de companhia com idade superior a 10 anos sejam causadas pelo câncer (GYLES, 2015; NATIONAL CANINE CANCER FOUNDATION, 2015).

O melanoma é uma neoplasia maligna originária dos melanócitos, que afeta o homem e os animais domésticos, como cão, gato e cavalo, e ainda, espécies silvestres e marinhas (NISHIYA et al., 2016). Cães e humanos compartilham semelhanças na patogênese e desenvolvimento da doença, que é caracterizada pela alta malignidade, potencial metastático e débil resposta terapêutica (HERNANDEZ et al., 2018). Contudo, diferentemente dos humanos, o melanoma em cães dificilmente afeta os locais expostos à radiação solar, sendo que a cavidade oral é o local mais acometido nesta espécie (SIMPSON et al., 2014). Sua magnitude na oncologia veterinária deve-se ao caráter de malignidade e comportamento agressivo, relacionado ao elevado índice de mortalidade dentre os pacientes oncológicos (NISHIYA et al., 2016). Carboplatina é considerada a droga quimioterápica de escolha para o tratamento do melanoma canino (DANK et al., 2014), porém, a mesma apresenta diversos efeitos colaterais (OUN et al, 2018).

Diante destas circunstâncias, os compostos de origem natural merecem ser investigados em relação às suas possíveis aplicações clínicas na terapia do câncer.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar a atividade citotóxica de compostos fenólicos, terpênicos e flavonoide frente às linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) e de rim bovino (MDBK), assim como associações destes compostos com quimioterápico comercial carboplatina.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Estabelecer o cultivo de linhagem celular de melanoma murino B16F10 para avaliar o efeito citotóxico de compostos fitoquímicos;
- Verificar a atividade citotóxica *in vitro* de ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol, gama terpineno e quercetina em células de linhagem B16F10;
- Avaliar o efeito citotóxico *in vitro* de ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol, gama terpineno e quercetina em células de linhagem MDBK;
- Avaliar o efeito citotóxico *in vitro* das associações entre o quimioterápico carboplatina e os compostos ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol, gama terpineno e quercetina em células de melanoma murino B16F10;

### **3 Revisão de Literatura**

#### **3.1 Conceito, mecanismo de desenvolvimento do câncer e melanoma**

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2018), o câncer corresponde à segunda maior causa de mortes no mundo em pessoas, depois das doenças cardiovasculares. Segundo estimativas, surgiram 582.590 novos casos de câncer no Brasil em 2018, sendo 282.450 casos em mulheres e 300.140 em homens (INCA, 2018), e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os índices de câncer duplicaram nos últimos 30 anos, e as projeções indicam que os casos e a mortalidade associada, irão continuar aumentando de forma progressiva (SOBRAL et al., 2014). Na medicina veterinária, o câncer também possui grande relevância, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em cães e gatos, principalmente quando idosos (SILVA, 2016). Estima-se que metade dos cães com mais de 10 anos de idade serão afetados pelo câncer, sendo que os cães de menor porte são menos acometidos. O índice de mortalidade decorrente é de até 60%, sendo este percentual variável em função da raça (NATIONAL CANINE CANCER FOUNDATION, 2015). Aproximadamente 4,2 milhões de cães são diagnosticados com câncer anualmente nos EUA. O câncer em cães ocorre espontaneamente, e tem fisiopatologia e apresentação clínica semelhante ao câncer humano, sendo que a análise genética de tumores caninos revelou características compartilhadas entre as duas espécies (SCHIFFMAN & BREEN, 2015).

O câncer surge a partir de mutações genéticas no DNA da célula, interferindo no metabolismo celular e no mecanismo de proliferação. Estas alterações ocorrem em proto-oncogenes, que são genes inativos em células normais, que ao serem ativados em oncogenes, transformam as células normais em células neoplásicas. As células alteradas adquirem características invasivas e passam a multiplicar-se de forma indiscriminada, invadindo tecidos adjacentes, acessando a circulação sanguínea e linfática, deslocando-se pelo organismo, atingindo tecidos e órgãos distantes ocasionando metástases. Também ocorrem a extinção de fatores supressores tumorais e apoptose, e progressão da angiogênese (INCA, 2018; VIANA et al., 2017).



Conforme o INCA (2018), o processo de desenvolvimento e formação do câncer, denominado carcinogênese, abrange três estágios: iniciação, - onde genes modificam-se pela ação dos agentes cancerígenos ou oncopromotores, porém o tumor ainda não é clinicamente detectável; promoção, - que ocorre a partir da célula iniciada, que foi geneticamente alterada e gradualmente transforma-se em maligna; e progressão, - caracteriza-se por multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, culminando com o surgimento das manifestações clínicas. O desenvolvimento do câncer é influenciado por fatores genéticos e externos ou ambientais, que atuam como carcinógenos ou oncopromotores, promovendo a iniciação ou progressão da carcinogênese. O sistema imunológico também desempenha um papel fundamental na patogenia, e o fortalecimento da imunidade constitui uma medida preventiva e terapêutica para os diversos tipos de câncer (CHANG & SHEN, 2014).

Dentre os cânceres de pele, destaca-se o melanoma, devido à alta malignidade (BERWICK et al., 2016). O melanoma possui origem neuroectodérmica, e forma-se a partir dos melanócitos, células originárias da crista neural, que durante o processo de embriogênese migram para a epiderme e são responsáveis pela produção de melanina, substância pigmentar que determina a cor da pele. Isto explica a alta capacidade de produzir metástases, já que a disseminação é uma característica inerente a este tipo celular (WAINSTEIN & BELFORT, 2018). Ao sofrerem mutações genéticas a partir da exposição prolongada a agentes carcinógenos, os melanócitos manifestam alterações em seu metabolismo e em sua capacidade proliferativa, que torna-se descontrolada (VARGAS et al., 2011). O melanoma afeta a pele e mucosas, e pode surgir em qualquer parte do corpo, na forma de sinais ou manchas, formando-se a partir de lesões pigmentadas pré-existentes, ou mesmo de pele íntegra, sem alterações. Manifesta-se através de lesões escurecidas com bordas irregulares, de tamanho, formato e coloração variáveis, acompanhadas de prurido ou descamação (INCA, 2018). É uma neoplasia heterogênea, com ampla variedade de subtipos histológicos, caracterizada por mutações genéticas e influenciada pela interação gene-ambiente (BERWICK et al., 2016).

A incidência mundial de melanoma aumentou drasticamente nos últimos 50 anos, bem como os índices de mortalidade decorrentes (BERWICK et al., 2016). No Brasil, o câncer de pele representa 30% dos tumores malignos registrados, e o

melanoma corresponde a 3% destes, sendo o mais preocupante, devido ao seu caráter de malignidade e alto potencial metastático (INCA, 2018).

A epidemiologia do melanoma é complexa, e os fatores de risco incluem exposição solar e à radiação UV (ultravioleta), condições individuais do hospedeiro, fatores genéticos, bem como, a interação entre estes elementos (BERWICK et al., 2016). Em humanos, a exposição prolongada ao sol e aos raios ultravioletas (UV) aumenta o risco da doença, bem como a condição de pele e cabelos claros, e histórico familiar de câncer de pele (INCA, 2018).

Além de representar um grave problema para a saúde humana, o melanoma também afeta de forma marcante os animais, principalmente os cães. Melanomas de cães e humanos compartilham semelhanças nas características histopatológicas, comportamento clínico e mecanismos moleculares envolvidos, com o desenvolvimento neoplásico gradativo, heterogeneidade individual e tumoral, alto índice de recidivas, além da propensão para desenvolver metástases em linfonodos regionais e em órgãos, como o encéfalo. Em relação ao tratamento, em ambas as espécies, o melanoma costuma ser resistente à quimioterapia e radioterapia (BERGMAN et al., 2013; HERNANDEZ et al., 2018; SIMPSON et al., 2014). Ademais, a estreita relação entre cães de estimação e humanos possibilita que compartilhem ambientes, e sejam expostos aos mesmos fatores potencialmente carcinógenos, que podem levar ao desenvolvimento e a progressão de tumores (HERNANDEZ et al., 2018).

Nos cães, os índices de melanoma situam-se em torno de 100.000 casos diagnosticados anualmente nos Estados Unidos, sendo considerado um tumor relativamente comum, com idade média de 11,6 anos no momento do diagnóstico (BERGMAN et al., 2013). Em relação à etiologia do melanoma canino, vários fatores estão relacionados, tais como suscetibilidade genética, consanguinidade, exposição química, hormonal e traumas. A radiação solar e UV também pode estar envolvida no desenvolvimento tumoral, principalmente em áreas expostas, como o rosto e orelhas (NISHIYA et al., 2016); porém, diferente do homem, a influência da radiação é menos significativa para o desenvolvimento do melanoma em cães, visto que possuem pelos, que protegem a pele (HERNANDEZ et al., 2018). No entanto, não há um consenso exato a respeito da etiologia do melanoma em cães (NISHIYA et al., 2016). Alguns autores citam predisposição genética e racial para o melanoma, sendo que os cães de pelo e pelagem preta ou pigmentada são mais predispostos, e a prevalência desta

doença é maior em cães de raças definidas, como schnauzer, doberman, scottish terrier, poodle, golden retriever, dachshund e cocker spaniel (BERGMAN et al., 2013; NISHIYA et al., 2016). O melanoma canino frequentemente acomete a cavidade oral, e costuma manifestar-se com menor frequência na pele, sendo este último sítio de prognóstico mais favorável, em contraste ao melanoma oral, que tem prognóstico desfavorável (BERGMAN et al., 2013; HERNANDEZ et al., 2018).

Para o diagnóstico de melanoma, tanto em humanos quanto em animais, recomenda-se avaliação completa dos pacientes através de exames clínicos, laboratoriais, histopatológicos e de imagem. Ainda, devem-se realizar avaliações periódicas em indivíduos pertencentes aos grupos de risco (humanos de pele clara, exposição solar crônica; cães de pelo e pelagem escura, histórico familiar) (BERGMAN et al., 2013; INCA, 2018; WAINSTEIN & BELFORT, 2018). Quando o melanoma é detectado em estágios iniciais, é possível intervir, e o prognóstico é favorável. Ultimamente, efetuou-se um incremento na sobrevivência dos pacientes, devido ao fomento à detecção precoce e à introdução de novas abordagens terapêuticas (INCA, 2018).

Para o controle e prevenção do melanoma, é fundamental considerar os fatores genéticos em conjunto com os fatores ambientais. Qualquer alteração na pele de seres humanos ou animais requer atenção e deve ser avaliada por um especialista (BERWICK et al., 2016).

### **3.2 Abordagem terapêutica de pacientes com melanoma**

Quando o melanoma é diagnosticado precocemente, o prognóstico do paciente é favorável, assim como as possibilidades de cura. Neste momento, o tratamento cirúrgico é o mais indicado, respeitando as margens cirúrgicas tumorais (INCA, 2018). Dependendo do grau de malignidade e do estágio da doença, a quimioterapia pode ser empregada (WAINSTEIN & BELFORT, 2018).

Os agentes mais utilizados nos protocolos quimioterápicos são a dacarbazina, temozolamida, cisplatina, carboplatina, nitrosouréias (carmustina e lomustina) e agentes que atuam sobre os microtúbulos (alcalóides da vinca e taxanos). A dacarbazina é um agente alquilante, e é considerado o quimioterápico padrão para o tratamento do melanoma metastático em humanos desde 1972. Ainda, estes medicamentos são utilizados em regimes de quimioterapia combinada entre eles, ou

associados com agentes adjuvantes, tais como imunoestimulantes (interferon e interleucina-2), hormônios (tamoxifeno) ou agentes biológicos (proteínas bcl-2) (WAINSTEIN & BELFORT, 2018; YANG et al., 2009).

O melanoma costuma ser resistente à radioterapia, porém esta pode ser utilizada para tratamentos paliativos (WAINSTEIN & BELFORT, 2018). Para o melanoma em estágio metastático, caracterizado pela proliferação das células tumorais para outros tecidos ou órgãos, a abordagem é mais criteriosa. Nestes casos, o objetivo é prolongar a evolução da doença, promover o bem-estar e aumentar a sobrevida do paciente. No entanto, atualmente existem novos medicamentos e muitas pesquisas baseadas em técnicas de imunologia e biologia molecular em andamento, com o objetivo de expandir o êxito do tratamento, como a imunoterapia (INCA, 2018; WAINSTEIN & BELFORT, 2018).

Na oncologia veterinária, o tratamento para pacientes com melanoma ainda não foi bem estabelecido, sendo a cirurgia e a quimioterapia as abordagens mais habituais (GYLES, 2015; HERNANDEZ et al., 2018). A cirurgia é indicada para o tratamento do melanoma canino localizado, como na cavidade oral, ocular, cutâneo e digital. Porém, em casos de metástase, a quimioterapia é recomendada, mas os resultados nem sempre são satisfatórios (HERNANDEZ et al., 2018). A quimioterapia consiste na aplicação de drogas citotóxicas, sendo que os derivados de platina (cisplatina e carboplatina) são os mais utilizados para esta finalidade (HERNANDEZ et al., 2018; NISHIYA et al., 2016). Para o melanoma canino, a carboplatina é a droga de primeira escolha (DANK et al., 2014), assim como para os felinos, visto que a cisplatina não é recomendada, pois apresenta toxicidade pulmonar para esta espécie, com graves repercussões sistêmicas, e risco de morte (SPUGNINI et al., 2011).

A radioterapia é menos utilizada, porém, pode ser eficaz para o controle de melanoma em cães, mas a resposta é satisfatória apenas em tumores menores e localizados (NISHIYA et al., 2016). A quimioterapia metronômica consiste na administração diária de agentes alquilantes em baixas doses, como a ciclofosfamida, clorambucil ou lomustina, geralmente em combinação com anti-inflamatórios não esteróides, como piroxicam ou meloxicam, para inibir a angiogênese (ADAMS, 2017). Outra opção é a eletroquimioterapia, que consiste na aplicação local de pulsos elétricos no tecido tumoral, promovendo a eletroporação das células, que torna a membrana celular mais permeável aos medicamentos antineoplásicos (ADAMS, 2017).

As perspectivas para a oncologia veterinária incluem as terapias direcionadas, a combinação de drogas, e a imunoterapia e suas vertentes, assim como para o melanoma humano (HERNANDEZ et al., 2018). Na veterinária, no âmbito da imunoterapia, já estão sendo utilizadas vacinas para o melanoma. A Oncept® é uma vacina terapêutica, desenvolvida pela Merial® (USA), e está comercialmente disponível desde 2007, para o tratamento do melanoma em cães. É uma vacina xenogênica, produzida com o gene da tirosinase humana, proteína expressa pelos melanócitos, envolvida na síntese de melanina. A vacina parece não curar o melanoma, porém, promove aumento da sobrevida (ADAMS, 2017; NISHIYA et al., 2016).

O câncer em cães e humanos compartilha semelhanças nas características genéticas, fisiopatologia e apresentação clínica. Portanto, os cães fornecem um poderoso recurso para a pesquisa oncológica, e a ocorrência natural do câncer nesta espécie serve como modelo para a compreensão da doença e suas particularidades. Neste âmbito, a oncologia comparada, fundamentada na investigação do câncer entre as espécies, permite que descobertas científicas a respeito desta doença beneficiem a saúde animal e humana (GYLES, 2015; SCHIFFMAN & BREEN, 2015).

Acredita-se que a melhor opção para o tratamento do melanoma humano e canino seja, invariavelmente, a identificação precoce das lesões em estágios iniciais da doença, para que consiga-se intervir de maneira expressiva, impactando no prognóstico e nos índices de mortalidade (BERWICK et al., 2016).

Embora muitos medicamentos para o tratamento do câncer possam ser clinicamente aplicáveis, as drogas convencionais são conhecidas por sua alta toxicidade celular e efeitos colaterais. Assim sendo, drogas anti-câncer eficazes, com mínima toxicidade ao paciente, são altamente desejáveis (CHUNG et al., 2004). A quimioterapia é o método mais utilizado para o tratamento do câncer em geral. No entanto, esta terapia induz efeitos adversos, visto que não afeta somente as células neoplásicas, mas também as células normais do organismo, implicando em consequências como diarreia, anemia, leucopenia e neutropenia, gerando imunossupressão e maior risco de adquirir infecções (RZEPECKA-STOJKO et al., 2015; VIANA et al., 2017). Assim, nas últimas décadas, esforços vem sendo concentrados para o desenvolvimento de terapias menos agressivas, frequentemente baseadas em produtos naturais, que pudessem atuar na proliferação das células

neoplásicas e na redução dos efeitos deletérios aos pacientes com câncer (RZEPECKA-STOJKO et al., 2015).

### 3.3 Aplicação de produtos naturais para a terapia do câncer

As formas alternativas para o tratamento do câncer estão difundindo-se mundialmente (RZEPECKA-STOJKO et al., 2015). Avanços tecnológicos possibilitam a pesquisa por novas moléculas de origem natural a serem utilizadas de forma isolada ou em associação com outras drogas, com o objetivo de destruir células neoplásicas sem prejudicar células saudáveis (SAMPATH et al., 2018). Estima-se que 60% das drogas aprovadas para o tratamento do câncer são derivadas de produtos naturais, ou são desenvolvidas por meio de conhecimentos gerados através da atividade de seus componentes (SHAILASREE et al., 2015). Muitos trabalhos têm descrito a utilização da medicina popular e extratos vegetais (SILVA, 2016) aumentando a resposta anti tumoral *in vivo* e *in vitro*, e inúmeras plantas apresentam potencial para originar novos agentes similares (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2012; FERRAZ et al., 2013; JIN et al., 2002; SAMPATH et al., 2018).

A resistência tumoral à quimioterapia convencional e os efeitos adversos inspiram a busca por novas opções terapêuticas, mais eficazes e com menores impactos deletérios ao organismo. Ainda, a própria quimioterapia pode ser beneficiada por substâncias naturais, que são potencialmente capazes de sensibilizar as células cancerígenas às drogas (RZEPECKA-STOJKO et al., 2015). Estas podem ser utilizadas para inibir a fase de iniciação do desenvolvimento tumoral, e neste âmbito reside o conceito de quimioprevenção, que baseia-se em deter a carcinogênese nos estágios iniciais, através do emprego de agentes naturais ou sintéticos. Desta forma, afeta-se o desenvolvimento de tumores e os processos subsequentes de invasão e metástase (RUSSO et al., 2014; RZEPECKA-STOJKO et al., 2015).

Muitos compostos naturais presentes na dieta, como os compostos fenólicos e flavonoides, induzem a apoptose nas células cancerígenas. A apoptose é uma das mais potentes defesas contra o câncer, visto que elimina as células mutantes potencialmente deletérias. Este processo de morte celular é ativado de forma intrínseca ou extrínseca, e as pró-caspases são transformadas em caspases ativas, levando à morte celular. O aumento das fases G0 e G1 no ciclo celular são indicadores

de apoptose, induzida por agentes causadores de dano ao DNA (ANANTHARAJU et al., 2016; RZEPECKA-STOJKO et al., 2015).

Desta forma, produtos derivados de plantas, como extratos e óleos essenciais e seus componentes químicos naturais vêm sendo extensivamente estudados por diversos grupos de pesquisa em oncologia no mundo inteiro, visto que muitos apresentam ações terapêuticas (CRAGG & NEWMAN 2019; ELANSARY & MAHMOUD, 2015; LOIZZO et al., 2008; PADUCH et al., 2007; RZEPECKA-STOJKO et al., 2015; SAMPATH et al., 2018; SOBRAL et al., 2014).

As plantas da família Lamiaceae mostram-se promissoras, já que seus extratos, óleos essenciais e compostos isolados apresentam propriedades terapêuticas variadas, como antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária (CAPELA, 2017; CLEFF et al., 2010; GIORDANI 2017; GUTERRES, 2015; WALLER et al., 2017), e ainda, atividade antineoplásica, demonstrada pelo efeito citotóxico em linhagens celulares neoplásicas humanas e animais, inclusive de melanoma (ELANSARY & MAHMOUD, 2015; GRONDONA et al., 2014; MOORE et al., 2016; PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2018; RUSSO et al., 2009; SILVA, 2016), inclusive em células de melanoma.

### **3.4 Propriedades medicinais e anticâncer de compostos fitoquímicos**

Os compostos fitoquímicos são derivados de plantas, e constituem uma heterogênea classe de moléculas com atividades farmacológicas, mostrando-se proveitosos para a terapia oncológica (RUSSO et al., 2014). Estudos com substâncias naturais e câncer têm sido desenvolvidos na tentativa de obtenção de moléculas promissoras, que interfiram na evolução do processo de carcinogênese, de forma a reduzir a adesão e migração de células neoplásicas, que são processos iniciais envolvidos na disseminação tumoral (BOUZAIENE et al., 2015).

A principal limitação dos produtos naturais e extratos vegetais é a manutenção de concentrações eficazes na circulação, devido a sua biodisponibilidade e peculiaridades farmacocinéticas (SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2019). As principais classes de compostos fitoquímicos com propriedades medicinais são os flavonoides, alcaloides, fenólicos e terpênicos (SAMPATH et al., 2018). Sendo que, os compostos fitoquímicos isolados possuem atividade antitumoral relatada por diversos autores (BOUZAIENE et al., 2015; CHUNG et al., 2004; SAMPATH et al., 2018; SHAILASREE

et al., 2015; SOBRAL et al., 2014), inclusive em células de melanoma (ASANOVA et al., 2003; FERRAZ et al., 2013; SRIVASTAVA & SRIVASTAVA, 2019).

### 3.4.1 Compostos flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários de plantas, e compreendem um extenso grupo de compostos polifenólicos de estrutura química e física variável, onipresentes nas plantas, e em alimentos como frutas, vegetais, chás e vinho (KUMAR & PANDEY, 2013). A diversidade de padrões estruturais dos flavonoides resulta em amplo espectro de atividades farmacológicas, tais como antioxidante, prevenção de doenças cardiovasculares, hepatoproteção, antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena. Em virtude destes atributos, os flavonoides e seus análogos sintéticos vem sendo intensamente estudados em relação a prevenção e tratamento de diversas afecções (KUMAR & PANDEY, 2013; RAVISHANKAR et al., 2013). Vários mecanismos moleculares são propostos para o efeito anticâncer dos flavonoides, que atuam nas fases de iniciação e promoção da carcinogênese, influenciando no desenvolvimento e progressão tumoral, através da modulação de diferentes enzimas e receptores, em vias relacionadas à inflamação, diferenciação celular, proliferação, apoptose, angiogênese, metástase e reversão da resistência a diferentes drogas (KUMAR & PANDEY, 2013; RAVISHANKAR et al., 2013; RUSSO et al., 2014). A biodisponibilidade e a atividade biológica dos flavonóides dependem da sua configuração, e da quantidade de grupos hidroxila em sua estrutura (KUMAR & PANDEY, 2013).

A quercetina representa o mais abundante flavonoide, sendo encontrado em uma variedade de frutas, vegetais e bebidas. Este composto apresenta uma gama de propriedades biológicas: antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, imunoestimulante, antimicrobiana, além de atuar na prevenção e terapia de doenças cardiovasculares e câncer (NAM et al., 2016; RUSSO et al., 2012; YUAN et al., 2015). Recentemente, muitas pesquisas têm focado em sua atividade antitumoral (JIANG et al., 2018; NAM et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016; YUAN et al., 2015). A quercetina pode ser considerada um agente quimiopreventivo ideal, visto que interfere em todos os estágios da carcinogênese, desde a iniciação até a invasão, e atua em diferentes aspectos genéticos, bioquímicos e imunológicos que sustentam o desenvolvimento e manutenção de tumores, com atividades anti-proliferativa, pró-



apoptótica, anti-angiogênica e efeito supressor de crescimento (RUSSO et al., 2012; YUAN et al., 2015). Em combinação com agentes quimioterápicos, a quercetina melhora a eficácia terapêutica, revertendo a resistência (YUAN et al., 2015), e apresentando baixa toxicidade para células normais (RUSSO et al., 2014). Entretanto, alguns pontos devem ser considerados ao avaliar as potencialidades desta molécula, como a pobre biodisponibilidade e baixa solubilidade (JIANG et al., 2018; RUSSO et al., 2012). Estas limitações podem ser contornadas através do uso de nanotecnologias e sistemas aprimorados de entrega e distribuição de drogas (ARAS et al., 2014; FAROOQI et al., 2018; JIANG et al., 2018).

### **3.4.2 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, e são encontrados em alimentos como grãos, cereais, frutas, legumes, café, chás e mel. O consumo regular destas substâncias tem sido relacionado com a redução da incidência de diversas enfermidades. Atividades antioxidantes, anti-inflamatória, anticâncer e combate de doenças associadas ao estresse oxidativo têm sido relacionadas aos fenólicos (ANANTHARAJU et al., 2016).

Segundo a literatura, os efeitos antineoplásicos são decorrentes da inibição da iniciação e progressão do câncer, através da modulação de processos essenciais. Ainda, parecem interferir em outros processos como bloqueio do ciclo celular; incremento de proteínas supressoras de tumores (tais como a p53); modulação dos níveis de eROS (espécies reativas do oxigênio); inibição de sinalizadores que controlam a proliferação celular, angiogênese e apoptose. A indução de apoptose é o principal mecanismo pelo qual os compostos fenólicos promovem o efeito anticâncer (ANANTHARAJU et al., 2016; RZEPECKA-STOJKO et al., 2015). Dentre os compostos fenólicos de relevância, podemos citar o ácido cafeico e o ácido p-cumárico.

O ácido cafeico caracteriza-se como um composto fenólico, sendo amplamente encontrado em vegetais e frutas, e pesquisado em virtude de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antineoplásicas (BOUZAIENE et al., 2015; CHUNG et al., 2004; JUNG et al., 2007; NAGAO et al., 2001; ROSENDAHL et al., 2015).

As propriedades terapêuticas do ácido cafeico estendem-se a alguns derivados, como o CAPE (ácido fenil éster cafeico), que apresenta melhor

biodisponibilidade em relação ao ácido cafeico. Este é um dos compostos majoritários do própolis que possui funções anticâncer muito relevantes, e é uma das moléculas de origem natural mais pesquisadas na esfera terapêutica oncológica (ANANTHARAJU et al., 2016; JUNG et al., 2007; RZEPECKA-STOJKO et al., 2015).

Em testes *in vivo*, o ácido cafeico retardou o crescimento tumoral e a angiogênese em ratos portadores de carcinoma renal humano xenográfico, além de não demonstrar citotoxicidade em células renais normais (JUNG et al., 2007).

O ácido p-cumárico é amplamente encontrado em plantas e alimentos, como tomate, cenoura, milho e amendoim (JAGANATHAN et al., 2013). O mesmo apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antidepressiva e antineoplásica, ao demonstrar atividade citotóxica em diversas linhagens celulares (BOUZAIENE et al., 2015; CHANG & SHEN, 2014; JAGANATHAN et al., 2013). Estudo conduzido por Shailasree e colaboradores (2015) demonstrou o efeito citotóxico do ácido p-cumárico em células de neuroblastoma, através da geração de eROS e disfunção mitocondrial, induzindo autofagia e apoptose. Além disso, o ácido p-cumárico é um produto seguro, visto que não induz toxicidade às células normais (CHANG & SHEN, 2014).

### **3.4.3 Compostos terpênicos**

Os compostos terpênicos ou terpenos constituem uma extensa e variada classe de compostos presentes na natureza, encontrados em plantas e vegetais, como flores, frutas e legumes. A fragrância típica de muitas plantas deve-se à presença dos terpenos, o que constitui um artifício atrativo ou repelente, importante na prevenção contra patógenos ou herbívoros. São muito utilizados pela indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética e como inseticidas (PADUCH et al., 2007; SOBRAL et al., 2014).

Os terpenos possuem propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitárias, antivirais, anti-inflamatórias, antialérgicas, imunomoduladoras, dentre outras, além de serem empregados na prevenção e terapia de diversas doenças, inclusive o câncer (PADUCH et al., 2007; SAMPATH et al., 2018; SOBRAL et al., 2014). Existem diversos mecanismos pelos quais os monoterpenos apresentam ação quimiopreventiva: atuação nas fases iniciais da carcinogênese, impedindo a interação dos carcinógenos com o DNA, ou durante a fase de promoção, inibindo a migração e desenvolvimento de células neoplásicas; em estágios mais avançados do processo

de desenvolvimento tumoral, induzem a apoptose celular, rediferenciação celular, além de interferir em mecanismos moleculares regulatórios. Ainda, promovem aumento da permeabilidade da membrana celular, promovendo perda da integridade estrutural da camada lipídica (GRONDONA et al., 2014; PADUCH et al., 2007). Alguns estudos mostram que os terpenos melhoram a penetração de agentes pela via transdérmica, que é uma alternativa para a administração de drogas antitumorais, principalmente para longos tratamentos (PADUCH et al., 2007).

Os terpenos são divididos em grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (SAMPATH et al., 2018). Os terpenos apresentam baixa toxicidade, e são considerados seguros, podendo ser utilizados em indivíduos com imunossupressão; porém, altas concentrações destes compostos podem vir a apresentar toxicidade (PADUCH et al., 2007). A atividade antitumoral de diversos óleos essenciais de plantas deve-se à presença de monoterpenos em sua composição (SOBRAL et al., 2014). Os terpenos são acessíveis, e constituem uma promissora classe de agentes para a oncologia.

O eucaliptol ou 1,8-cineol é um monoterpeno de aroma característico, que apresenta atividades anti-inflamatórias, analgésicas, antioxidantes, antiproliferativas, anti-invasivas, antiangiogênicas e pró-apoptóticas (SOBRAL et al., 2014), demonstrando efeito citotóxico em diversas linhagens celulares tumorais, como carcinoma oral (CHA et al., 2010), carcinoma de pele (SAMPATH et al., 2018) e melanoma (ASANOVA et al., 2003).

O gama terpineno é um composto volátil da classe dos monoterpenos, sendo constituinte majoritário de diversos óleos essenciais, como o de eucalipto (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2012). Este composto demonstrou atividades antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias e citotóxicas (BORGOU et al., 2010; DÖLL-BOSCARDIN et al., 2012; FERRAZ et al., 2013; SOBRAL et al., 2014).

### **3.5 Determinação da citotoxicidade de produtos naturais**

Os produtos naturais com atividades biológicas promissoras requerem ser avaliados não apenas quanto a sua eficácia, mas também em relação a sua toxicidade e segurança para o organismo. Portanto, numa perspectiva terapêutica, a avaliação da toxicidade celular é de suma importância, pois é essencial a um composto atuar seletivamente nas células neoplásicas, com mínimas alterações em células normais,

considerando a possível utilização destas substâncias para a prospecção de medicamentos (BEDNARZUK, et al., 2010; BLANK, 2013; RAFIQ et al., 2015).

Os ensaios para investigação das atividades biológicas de produtos naturais necessitam ser complementados pelos ensaios de citotoxicidade, e estes constituem uma etapa preliminar no estudo de qualquer substância, pois a toxicidade é um aspecto restritivo ao seu emprego como medicamento (BEDNARZUK, et al., 2010; BLANK, 2013; SILVA, 2016). Nos testes de citotoxicidade, são avaliados os efeitos que as moléculas promovem a nível celular, e para tal, são amplamente utilizados os cultivos celulares, que são estabelecidos a partir de células obtidas de órgãos ou tecidos de animais ou seres humanos. Considerando a crescente preocupação da sociedade em geral acerca da utilização de animais de laboratório em pesquisas, e os princípios do bem-estar animal, a utilização de cultivos celulares constitui uma alternativa conveniente, e que apresenta vantagens como a praticidade, sensibilidade e reprodutibilidade (BEDNARZUK, et al., 2010; BONES & MOLENTO, 2012).

A linhagem celular B16F10 de melanoma murino tem sido frequentemente utilizada em testes laboratoriais, e foi estabelecida por Fidler em 1973. É oriunda do melanoma murino B16, de natureza maligna e metastática. Para o seu desenvolvimento, células foram coletadas de tumor primário subcutâneo de camundongos C57BL/6, e cultivadas em laboratório até a obtenção da linhagem B16F10, que possui comportamento agressivo e capacidade invasiva e metastática. Estas células também são bastante utilizadas para testes *in vivo*, através da inoculação experimental em camundongos para o desenvolvimento de tumores (DA SILVA et al., 2013; VIANA et al., 2017). As células de melanoma são de fácil manutenção em cultivo laboratorial, por sua alta capacidade proliferativa. Desta forma, constituem-se em excelente modelo para avaliar a atividade de agentes antiproliferativos, como os fitoterápicos (LEAL et al., 2003).

Diversas metodologias são utilizadas para avaliação da toxicidade celular de diferentes produtos ou compostos, e determinados agentes promovem danos na membrana mitocondrial, através da despolarização, alterando assim sua permeabilidade (DÖLL-BOSCARDIN et al., 2012). O ensaio do MTT é amplamente utilizado para esta finalidade. Constitui-se em um ensaio colorimétrico, onde, através da redução do sal MTT, avalia-se a atividade enzimática mitocondrial celular, ou a ausência desta, indicando lesão preliminar que culmina com a morte celular (MOSMANN, 1983).

Apesar das vantagens da utilização de testes de citotoxicidade *in vitro*, estes podem não demonstrar de forma completamente fidedigna os efeitos que determinada substância exerceria em um organismo vivo, visto que em cultivos celulares não é possível reproduzir os processos metabólicos e de biotransformação (SILVA, 2016). Portanto, apesar da aplicabilidade dos ensaios de citotoxicidade estes são considerados preliminares e de triagem, sendo recomendado que a partir destes, testes *in vivo* subsequentes sejam realizados para a validação de substâncias ou compostos (BLANK, 2013).

## **4 Artigos**

### **Artigo 1**

#### **Cytotoxic activity *in vitro* of phytochemical compounds in B16F10 melanoma cells and MDBK**

GONÇALVES, Helena Piúma\*; HÜBNER, Silvia de Oliveira; Pedro Sica, CRUZEIRO; SILVA, Cristine Cioato; PICCOLI, Tony; CLEFF, Marlete Brum

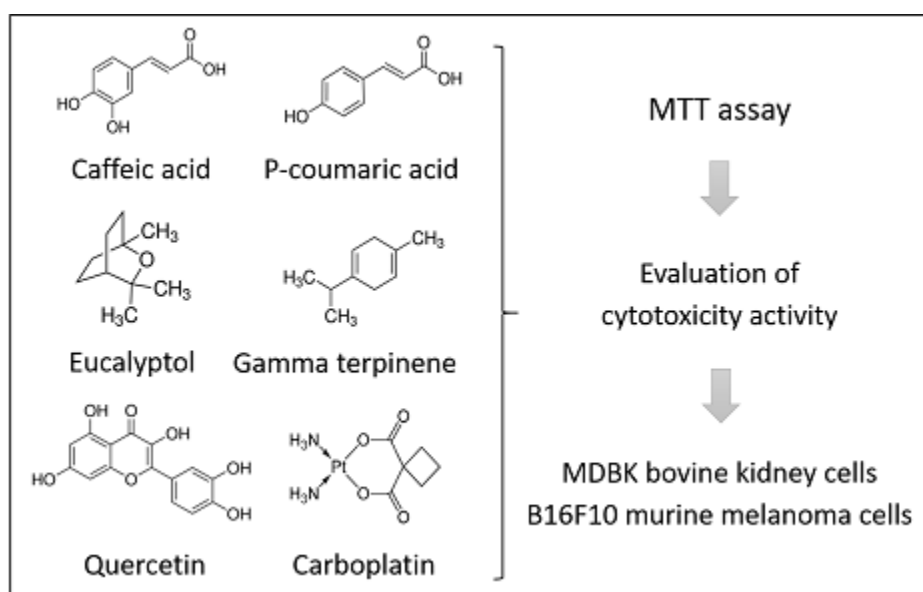
Submetido à revista Natural Product Research

## Cytotoxic activity *in vitro* of phytochemical compounds in B16F10 melanoma cells and MDBK

GONÇALVES, Helena Piúma\*; CLEFF, Marlete Brum; HÜBNER, Silvia de Oliveira; Pedro Sica, CRUZEIRO; SILVA, Cristine Cioato; PICCOLI, Tony

\*Universidade Federal de Pelotas (Campus Universitário - Capão do Leão, RS, Brasil CEP: 96160-000). E-mail: helenapiuma@gmail.com

### Graphical abstract



### ABSTRACT

Phytochemicals exhibit promising antineoplastic activity. Melanoma shows malignancy and metastatic potential, and conventional therapies promote deleterious effects on the organism. These limitations stimulate the investigation of new molecules for the treatment of melanoma, aiming for safe and effective results. Therefore, the objective of this work was to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity of phenolic compounds (caffeic and p-coumaric acids), terpenes (eucalyptol and gamma terpinene) and flavonoid (quercetin) in murine melanoma (B16F10) and bovine kidney (MDBK) cells, and the chemotherapeutic carboplatin was used as control. Eight concentrations of the compounds (3 to 0.02 mg.mL<sup>-1</sup>) were evaluated by the MTT method. The compounds showed high cytotoxic activity in B16F10 cells at concentrations 1.5 mg.mL<sup>-1</sup> (caffeic acid and gamma terpinene), 0.75 mg.mL<sup>-1</sup> (p-coumaric acid, eucalyptol and

quercetin) with low toxicity in renal cells. Quercetin demonstrated high selectivity index ( $IS \geq 100$ ) for B16F10. These phytochemicals are promising, however studies should be proceed.

**Keywords:** caffeic acid; carboplatin; eucalyptol, gamma terpinene, quercetin, p-coumaric acid

## 1. Introduction

The plants represent an inestimable source of bioactive resources of pharmacological interest, with emphasis on the secondary metabolites, which are chemical compounds of low molecular mass, and that present diverse biological activities (Blank et al. 2017; Cleff et al. 2010; Cragg and Newman, 2013; De Matos et al. 2016; Silva, 2016; Sobral et al. 2014). Phytochemicals have been widely explored because of their importance in cancer prevention and therapy, through modulation of different cellular processes and interference in the progression of cancer and metastases, as well as low toxicity and reduced side effects (Nam et al. 2016; Russo et al. 2014; Srivastava et al. 2016). Phytochemical compounds include flavonoids, phenolics and terpenes. These compounds have been extensively explored, due to their antioxidant properties (Russo et al. 2014; Srivastava et al. 2016), anti-inflammatory (Paduch et al., 2007), antimicrobial (Cleff et al. 2010; De Matos et al. 2016; Giordani, 2017; Guterres, 2015; Waller et al. 2017), antiparasitic (Capella, 2017), besides anticancer activity (Silva, 2016; Sobral et al. 2014; Srivastava et al. 2016). Melanoma is a skin cancer that develops from melanocytes. Genetic and environmental factors are involved in its pathogenesis, and it stands out for the high malignancy and metastatic potential, with increasing incidence and mortality, presenting little responsiveness to conventional treatments (Harris et al. 2016; Vargas et al. 2011). In addition to setting up a problem for human health, melanoma also affects animals significantly (Hernandez et al. 2018; Silva, 2016). Chemotherapy is the most widely used treatment for melanoma (Srivastava et al. 2016; Viana et al. 2017), however, it promotes systemic toxicity and a decrease in patient's quality of life, and in cases of advanced or metastatic melanoma, it is usually ineffective (Vargas et al. 2011). Platinates are the drugs of choice for the treatment of melanoma in human and veterinary medicine (Cunha et al. 2013). Among these, carboplatin is regularly used, and although effective, its use is limited by adverse effects (Oun et al. 2018). These limitations stimulate the investigation of new therapeutic modalities for the treatment of cancer, particularly melanoma, aiming for better results, with safety, specificity and efficacy (Srivastava et al. 2016; Viana et al. 2017). Given the antineoplastic potential and pharmacological application, phytochemical compounds require evaluation in melanoma cells, since this is a cancer type with high morbidity and mortality



rates, where treatments are limited. Thus, the present study aimed to evaluate the cytotoxic activity of phenolic compounds (caffeic acid and p-coumaric acid), terpenes (eucalyptol and gamma terpinene) and flavonoid (quercetin) in neoplastic melanoma (B16F10) and non-neoplastic (MDBK) cells, and the commercial chemotherapy drug carboplatin was used as a positive control.

## 2. Results and discussion

The phenolics, terpenes and flavonoid compounds used in this study were selected because of previous studies where they were constituents of plant extracts that demonstrated promising activities (Blank et al. 2013; Cleff et al. 2010; Giordani, 2017; Silva, 2016; Waller et al. 2017). Analyzing the results, it was observed that phytochemicals inhibited the proliferation of B16F10 neoplastic cells at all concentrations tested, with variable results depending on the type of compound and the concentration used, and the flavonoid quercetin resulted in higher cytotoxicity for B16F10 cells, whereas the lower cytotoxicity was observed with gamma terpinene. Regarding the carboplatin chemotherapy, evaluated from 1 mg.mL<sup>-1</sup>, low toxicity to melanoma cells was observed at all concentrations tested, with a percentage of cell viability between 75 and 100% (Figure 1).

The treatments quercetin (mean cell viability 33%) and gamma terpinene (mean cell viability 77%) differed statistically at all concentrations ( $p < 0.05$ ), whereas the eucalyptol, p-coumaric acid and caffeic acid statistically equal, with mean cell viability for B16F10 around 60%. DMSO was used to dissolve the phytochemical compounds, and toxicity was assessed where it showed low toxicity to B16F10 cells when tested at concentrations of 2 to 0.03%.

The compounds showed dose-dependent toxicity in MDBK cells, with higher levels of toxicity at higher concentrations (Figure 2). Considering the averages of all concentrations evaluated, the compounds may be increasingly sorted according to their toxicity to renal cells: gamma terpinene (87% cell viability) > quercetin (85%) > eucalyptol (80%) > p-coumaric acid (79%) > caffeic acid (75%).

In figure 3, are compared the cellular viabilities of B16F10 and MDBK in different concentrations, which showed high toxicity to B16F10 cells and low toxicity to MDBK cells. When considering the mean of all concentrations evaluated (3 to 0.02 mg.ml<sup>-1</sup>), quercetin showed high viability in MDBK cells (85%), being considered low toxicity as well as high toxicity for neoplastic cells (33%). The phenolic compounds caffeic and p-coumaric acid presented viability of 75% and 79% in MDBK cells, and 62% and 64% in B16F10 cells, respectively, and the terpenes eucalyptol and gamma terpinene presented 80% and 81%

viability in MDBK and 66% and 77% in B16F10. These values correspond to low toxicity to renal cells and moderate toxicity to neoplastic cells.

The selectivity index of the compounds, as well as the  $CC_{50}$  of MDBK cells and neoplastic cells (B16F10), are shown in Table 1. Quercetin showed high selectivity index ( $IS \geq 100$ ), proving to be a highly selective compound for neoplastic cells.

Table 1. Values for  $CC_{50}$  of the compounds (cytotoxic concentration to 50% of cells) of MDBK cells and neoplastic cells (B16F10), and the selectivity index of the compounds.

	$CC_{50}$ MDBK cells	$CC_{50}$ B16F10 cells	Selectivity index
Caffeic acid	3 mg. mL <sup>-1</sup>	0,75 mg. mL <sup>-1</sup>	4
P-coumaric acid	3,5 mg. mL <sup>-1</sup>	0,75 mg. mL <sup>-1</sup>	4,6
Eucalyptol	1,5 mg. mL <sup>-1</sup>	0,5 mg. mL <sup>-1</sup>	3
Gamma terpinene	3 mg. mL <sup>-1</sup>	3 mg. mL <sup>-1</sup>	1
Quercetin	4 mg. mL <sup>-1</sup>	0,04 mg. mL <sup>-1</sup>	100

Phytochemical compounds such as caffeic acid, p-coumaric acid, eucalyptol, gamma terpinene and quercetin are widely found in plants and vegetables, and are major constituents of various extracts and vegetable oils that have antibacterial, antifungal, antiparasitic and antineoplastic properties, as *Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis*, *Eugenia uniflora* e *Polygonum hydropiperoides*, showing promising to continue the studies (Blank et al. 2017; Capella, 2017; De Matos et al. 2016; Giordani, 2017; Guterres, 2015; Silva, 2016; Waller et al. 2017).

In the literature, were found works investigating the antineoplastic activity of the phytochemical compounds, especially on a quercetin. The antineoplastic activity presented by quercetin in B16F10 cells in our study has been reported in other studies, which highlight the molecule as promising for cancer therapy, in addition to exhibiting chemopreventive characteristics (Russo et al. 2014; Srivastava et al. 2016). Confirming our results, quercetin was evaluated on A375 human melanoma cells (Srivastava and Srivastava, 2019), where it demonstrated antiproliferative activity in the MTT assay, with  $CC_{50}$  of 0,006 mg.mL<sup>-1</sup>, whereas in our study,  $CC_{50}$  in murine melanoma cells was 0.04 mg.mL<sup>-1</sup>. This difference is probably due to the different cell types used. Quercetin has been considered a pleiotropic molecule, which acts on multiple intracellular targets, affecting different signaling pathways in neoplastic cells,

and affecting all stages of carcinogenesis, from initiation to invasion and metastasis, with no or limited toxicity to normal cells (Russo et al. 2014; Srivastava et al. 2016).

The caffeic acid had a dose-dependent effect on the viability of melanoma cells (B16F10), similarly to that observed in Chung et al. (2004) study, where this compound demonstrated effect on the proliferation of human hepatocellular carcinoma, and reduced the viability of neoplastic cells by 61% at the concentration of 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>, as well as inhibited the growth of human breast cancer cells (MCF-7, T47D e MDA-MB-231), at the concentration of 0,006 mg.mL<sup>-1</sup> (Rosendahl et al. 2015). Studies have shown that caffeic acid has potential against skin cancer, since it suppresses carcinogenesis by inhibiting the expression of mediators associated with proliferation, angiogenesis and cell migration (Kang et al. 2008). Bouzaiene et al. (2015) evaluated the phenolic compounds caffeic acid and p-coumaric acid at concentrations of 0,006 and 0,12 mg.mL<sup>-1</sup>, showing significant inhibition of colon cancer (HT29-D4) and lung cancer cells (A549), and suggested that anticancer activity occurred due to reduction of cell proliferation, adhesion and migration, showing promising anti-metastasis agents. Jaganathan et al. (2013) found an inhibitory effect of honey on the proliferation of colorectal carcinoma cells (HCT15 and HT29), as well as p-coumaric acid, one of its major compounds, demonstrating inhibitory activity in cells with values of CC<sub>50</sub> 0,16 and 0,19 mg.mL<sup>-1</sup>, in addition to promoting the induction of apoptosis. P-coumaric acid also demonstrated inhibitory activity against breast cancer cells (CC<sub>50</sub> 0,08 mg.mL<sup>-1</sup>), colorectal (CC<sub>50</sub> 0,02 mg.mL<sup>-1</sup>) and liver (CC<sub>50</sub> 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>), and cell cycle analysis confirmed that the compound leads to apoptosis (Chang and Shen, 2014).

Eucalyptol, in our study with B16F10 cells showed moderate or high toxicities, depending on the concentration used. This has been shown by other authors, who have reported pronounced antitumor activity in melanoma cells (H157 and HT144 lines), with inhibition rates of 95 and 96%, respectively (Asanova et al. 2003). According to the literature, eucalyptol causes cytotoxicity and induces mitochondrial and caspase-dependent apoptosis when used in human oral squamous cell carcinoma (KB) (Cha et al. 2010). Eucalyptol has been shown to be a potential candidate for skin carcinoma (A431), through cytotoxic effect and generation of ROS, induction of apoptosis and cell cycle arrest, through increased expression of the p53 protein. However, the effect on normal keratinocytes was minimal (Sampath et al. 2018). In the study by Wang et al. (2012), ovarian cancer cells (SK-OV-3 and HO-8910) and hepatocellular carcinoma (Bel-7402) treated with eucalyptol exhibited low cytotoxicity. Among the compounds evaluated in this study, gamma terpinene was the least effective in B16F10 melanoma cells. Ferraz et al. (2013) evaluated gamma terpinene in murine melanoma

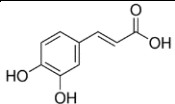
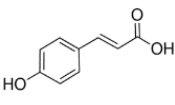
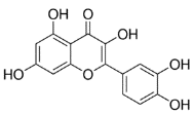
(B16F10), hepatocellular carcinoma (HepG2) and normal lymphocytes (PBMC), observing cytotoxicity ( $CC_{50}$  0,009  $mg.mL^{-1}$ ) for B16F10 cells, lower values than our study, where the  $CC_{50}$  of gamma terpinene for B16F10 was 2,2  $mg.mL^{-1}$ . Gamma terpinene showed cytotoxicity in Jurkat leukemia line with  $CC_{50}$  of 0.13  $mg.mL^{-1}$  and was not cytotoxic to murine macrophage (J774A.1) and cervical tumor cells (HeLa) in concentrations up to 0,3  $mg.mL^{-1}$ . Another comparative study demonstrated a superior effect of *Eucalyptus benthamii* essential oil against tumor cells when compared to the isolated terpene compounds, which was attributed to the synergistic effect between the constituents of the oil (Döll-boscardin et al. 2012).

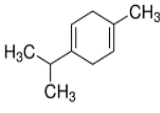
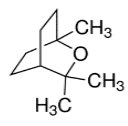
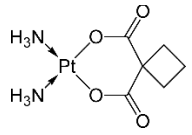
The cytotoxic activities demonstrated by each compound may be closely related to their physico-chemical and structural characteristics, such as the number of carbon atoms in the chain and the hydroxyl groups (Paduch et al. 2007). Thus, it is observed that the antineoplastic activity of quercetin, which stands out in relation to the other compounds, can be justified by the greater amount of hydroxyl groups in its structure (Kumar and Pandey, 2013).

### 3. Experimental

The compounds caffeic acid, p-coumaric acid, quercetin, eucalyptol and gamma terpinene, purity  $\geq 95\%$  were obtained commercially (Sigma-Aldrich®, USA), as well as the chemotherapeutic carboplatin (Blau Pharmaceutical S/A). The compounds and the chemotherapeutic used, as well as their origin, class, formula and chemical structure, and the concentrations evaluated, are described in table 2.

Table 2. Description of the commercially acquired compounds and chemotherapeutics and the concentrations used in the in vitro experiment on B16F10 and MDBK cells.

Identification	Origin	Chemical classes	Chemical formula	Chemical structure	Concentration assessed
Caffeic acid	Sigma-Aldrich®	Phenolic	$C_9H_8O_4$		3 - 0,02 $mg.mL^{-1}$
P-coumaric acid	Sigma-Aldrich®	Phenolic	$C_9H_8O_3$		3 - 0,02 $mg.mL^{-1}$
Quercetin	Sigma-Aldrich®	Flavonoid	$C_{15}H_{10}O_7$		3 - 0,02 $mg.mL^{-1}$

Gamma terpinene	Sigma-Aldrich®	Terpene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>		3 - 0,02 mg.mL <sup>-1</sup>
Eucalyptol	Sigma-Aldrich®	Terpene	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O		3 - 0,02 mg.mL <sup>-1</sup>
Carboplatin	Blau pharmaceut. S/A	Platinum derivatives	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Pt		1 - 0,007 mg.mL <sup>-1</sup>

The B16F10 (murine melanoma) and MDBK (bovine kidney) cell lines used were provided by Fundação Universidade de Rio Grande and Laboratório de Virologia (LABVIR) – UFPel, respectively. During the experiment, B16F10 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, Sigma-Aldrich®), added antibiotic, antifungal, glutamine and 10% fetal bovine serum (SFB, Gibco®), and the MDBK cells were kept in minimum essential medium (E-MEM, Sigma-Aldrich®), added antibiotic, antifungal and 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco®), and stored at 37° C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. For determination of cytotoxicity in both cell lines, stock solutions were prepared containing 1 ml aliquots of each of the compounds, which were dissolved in 0.5% dimethylsulfoxide (DMSO), and diluted in E-MEM and D- MEM (Sigma-Aldrich®, USA) and adjusted to a pH of 7.7. Eight concentrations of each of the compounds were used, starting from the initial concentration of 3 mg.mL<sup>-1</sup> a 0,02 mg. mL<sup>-1</sup>, in serial dilutions.

B16F10 and MDBK cells were seeded into 96 well plates, and after the formation of the cell carpet the compounds were added in triplicate. After 24 hours of incubation at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, cell viability was assessed according to Mosmann (1983), using the MTT method (Sigma-Aldrich®, USA), with subsequent spectrophotometer reading at 540 nm. MDBK cells treated only with E-MEM and B16F10 cells treated with D-MEM alone were used as controls. Control with the DMSO solvent on B16F10 cells was also performed.

The classification of the compounds for cellular toxicity and antiproliferative effect was based on Mahmoud et al. (2011). High cytotoxicity was considered when cell viability was between 1 and 50%; moderate cytotoxicity when viability was between 51 and 75% and low cytotoxicity when viability was between 75 and 100%. The percentage of cell viability was evaluated using the following formula:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{mean of treatment}}{\text{meand of control}} \times 100$$

The selectivity index of the compounds was also considered and consisted of the ratio between the CC<sub>50</sub> (cytotoxic concentration of the compound to 50% of the cells) of the MDBK (non-neoplastic) cells and the CC<sub>50</sub> of the neoplastic cells (B16F10). The higher the ratio, the more selective was the compound for the neoplastic cells, and consequently the lower the effect on the normal cells. The selectivity index was evaluated using the following formula:

$$\text{Selectivity index} = \frac{\text{CC50 non neoplastic cells (MDBK)}}{\text{CC50 neoplastic cells (B16F10)}}$$

Statistical analysis was performed using SPSS 20.0, using analysis of variance (ANOVA), comparing the means of cell viability by the Tukey test in relation to the different compounds and the eight concentrations used. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## Conclusions

According to the results, it is concluded that phytochemicals are promising for antitumor activity, especially quercetin, which demonstrated a high selectivity index for melanoma cells. Caffeic acid, p-coumaric acid, eucalyptol and gamma terpinene showed low selectivity for B16F10, however other concentrations should be evaluated, as well as the sequence of studies, given the promising results observed.

**Disclosure statement:** No potential conflicts of interest were reported by authors.

**Acknowledgments:** The authors thanks UFPel, CAPES, CNPq e FAPERGS.

## References

Asanova, Z. K., Suleimenov, E. M., Atazhanova, G. A., Dembitskii, A. D., PAK, R. N., DAR, A., Adekenov, S. M. Biological activity of 1, 8-cineole from levant wormwood. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 37, n. 1, p. 28-30, 2003.

Blank, Daiane. 2013. Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família Lamiaceae [Investigation of cytotoxicity and anti-viral activity of plant extracts of the family Lamiaceae] [master's thesis]. Pelotas (RS): Federal University of Pelotas.

Blank, D. E.; Alves, G. H.; Freitag, R. A.; Correa, R. A.; De Oliveira Hubner, S.; Cleff, M. B. Composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare L.* e *Rosmarinus officinalis*

[Chemical composition and cytotoxicity of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis*]. Science And Animal Health, v. 4, n. 2, p. 117-130, 2017.

Bourgou, S., Pichette, A., Marzouk, B., Legault, J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. South African Journal of Botany, v. 76, n. 2, p. 210-216, 2010.

Bouzaiene, N., Jaziri, S. K., Kovacic, H., Chekir-ghedira, L., Ghedira, K., Luis, J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. European journal of pharmacology, v. 766, p. 99-105, 2015.

Capella, G A. 2017. Ambiente como fonte de formas parasitárias e potencial de extratos vegetais da família Lamiaceae contra parasitos do gênero Toxocara [Environment as a source of parasitic forms and potential of plant extracts of the family Lamiaceae against parasites of the genus Toxocara] [master's thesis]. Pelotas (RS): Federal University of Pelotas.

Cha, J. D., Kim, Y. H., Kim, J. Y. Essential oil and 1, 8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation. Food Science and Biotechnology, v. 19, n. 1, p. 185-191, 2010.

Chang, M. Y., Shen, Y. L. Linalool exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity. Molecules, v. 19, n. 5, p. 6694-6706, 2014.

Chung, T. W., Moon, S. K., Chang, Y. C., Ko, J. H., Lee, Y. C., Cho, G., Kim C. H. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. The FASEB Journal, v. 18, n. 14, p. 1670-1681, 2004.

Cleff, M. B., Meinerz, A. R. M., Faria, R. O. D., Xavier, M. O., Santin, R., Nascente, P. D. S., Meireles, M. C. A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária [Inhibitory activity of oregano essential oil in fungi of medical and veterinary importance]. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010.

Cragg, G. M., Newman, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

Cunha, S. D. S., Holguin, P. G., Corgozinho, K. B., D e Azevedo, S. C. S., De Carvalho, L. A. V., Ferreira, A. M. R. Radiation therapy as an adjuvant therapy for the treatment of oral melanoma in a dog. Acta Scientiae Veterinariae, v. 41, n. 1, 2013.

De Matos, C. B., Guterres, K. A., Giordani, C., Madrid, I. M., Cleff, M. B., Meireles, M. C. A. Germicidal activity of plant extracts of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against *Sporothrix schenckii* complex. Acta Veterinaria Brasilica, v. 10, n. 3, p. 246-252, 2016.

Döll-boscardin, P. M., Sartoratto, A., Maia, S., De Noronha, B. H. L., Padilha de Paula, J., Nakashima, T., Kanunfre, C. C. *In vitro* cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2012, 2012.

Ferraz, R. P., Bomfim, D. S., Carvalho, N. C., Soares, M. B., Da Silva, T. B., Machado, W. J., Bezerra, D. P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis Schauer* (Verbenaceae). *Phytomedicine*, v. 20, n. 7, p. 615-621, 2013.

Giordani, C. 2017. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos [Antimicrobial activity of plant extracts and toxicity in alternative models] [dissertation]. Pelotas (RS): Federal University of Pelotas.

Guterres, K A. 2015. Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospeção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae [Microorganisms of cutaneous lesions of small animals: Resistance to antimicrobials and bioprospection of extracts of plants of the family Lamiaceae and Fabaceae.] [master's thesis]. Pelotas (RS): Federal University of Pelotas.

Harris, Z., Donovan, M. G., Branco, G. M., Limesand, K. H., Burd, R. Quercetin as an emerging anti-melanoma agent: a four-focus area therapeutic development strategy. *Frontiers in nutrition*, v. 3, p. 48, 2016.

Hernandez, B., Adissu, H., Wei, B. R., Michael, H., Merlino, G., Simpson, R. Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 2, p. 394, 2018.

Jaganathan, S. K., Supriyanto, E., Mandal, M. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 19, n. 43, p. 7726, 2013.

Kang, N. J., Lee, K. W., Shin, B. J., Jung, S. K., Hwang, M. K., Bode, A. M., Dong, Z. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*, v. 30, n. 2, p. 321-330, 2008.

Kumar, S., Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, v. 2013, 2013.

Mahmoud, T.S.; Marques, M.R.; Pessoa, C.O.; Lotufo, L.V.C.; Magalhães, H.I.F; Moraes, M.O.; Lima, D.P.; Tininis, A.G.; Oliveira, J.E. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.21, n.3, p.456-464, 2011.

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

Nam, J. S., Sharma, A. R., Nguyen, L. T., Chakraborty, C., Sharma, G., Lee, S. S. Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine. *Molecules*, v. 21, n. 1, p. 108, 2016.

Oun, R., Moussa, Y. E., Wheate, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Transactions*, v. 47, n. 19, p. 6645-6653, 2018.

Paduch, R., Kandeferszyszen, M., Trytek, M., Fiedurek, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, v. 55, n. 5, p. 315, 2007.



Rosendahl, A. H., Perks, C. M., Zeng, L., Markkula, A., Simonsson, M., Rose, C., Jernstrom, H. C. Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor (ER) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) levels in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*, p.1748-2014, 2015.

Russo, G. L., Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., Iannitti, R., Palumbo, R. Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. *Advances in nutrition and cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 185-205, 2014.

Sampath, S., Subramani, S., Janardhanam, S., Subramani, P., Yuvaraj, A., Chellan, R. Bioactive compound 1, 8-Cineole selectively induces G2/M arrest in A431 cells through the upregulation of the p53 signaling pathway and molecular docking studies. *Phytomedicine*, 2018.

Silva, C C. 2016. Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK) [Retrospective study of cutaneous canine melanomas and determination of the cytotoxic activity of plant products against neoplastic cells (B16F10) and non-neoplastic cells (MDBK)] [master's thesis]. Pelotas (RS): Federal University of Pelotas.

Srivastava, S., Somasagara, R. R., Hegde, M., Nishana, M., Tadi, S. K., Srivastava, M., Raghavan, S. C. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Scientific reports*, v. 6, p. 24049, 2016.

Srivastava, N. S.; Srivastava, R. A. K. Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. *Phytomedicine*, v. 52, p. 117-128, 2019.

Sobral, M. V., Xavier, A. L., Lima, T. C., De Sousa, D. P. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.

Vargas, A. J., Sittadjody, S., Thangasamy, T., Mendoza, E. E., Limesand, K. H., Burd, R. Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: quercetin and the central role of p53. *Integrative cancer therapies*, v. 10, n. 4, p. 328-340, 2011.

Viana, A. R., Marzari, J., Wergutz, J., Krause, L. M. F. Produtos bioativos na prevenção e no tratamento do câncer, em especial o melanoma [Bioactive products in the prevention and treatment of cancer, especially melanoma]. *Disciplinarum Scientia| Saúde*, v. 18, n. 3, p. 511-528, 2017.

Waller, S. B., Cleff, M. B., Serra, E. F., Silva, A. L., Dos Reis Gomes, A., De Mello, J. R. B., Meireles, M. C. A. Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. *Microbial pathogenesis*, v. 104, p. 232-237, 2017.

Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., Efferth, T. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, v. 17, n. 3, 2012.

## FIGURES

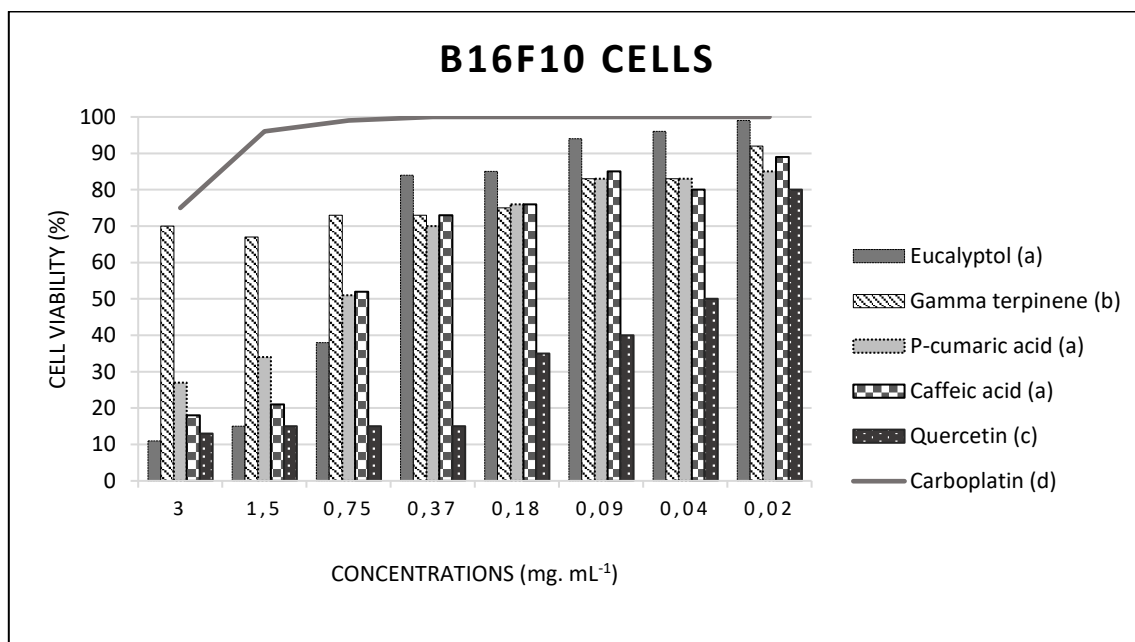


Figure 1. Graphical demonstration of cytotoxic activity of different concentrations of phytochemical compounds (3 to 0.02 mg.mL<sup>-1</sup>) and carboplatin (1 to 0.07 mg.mL<sup>-1</sup>) in B16F10 melanoma cells. \* (a, b, c, d: different letters show statistical difference between treatments,  $p < 0.05$ ).

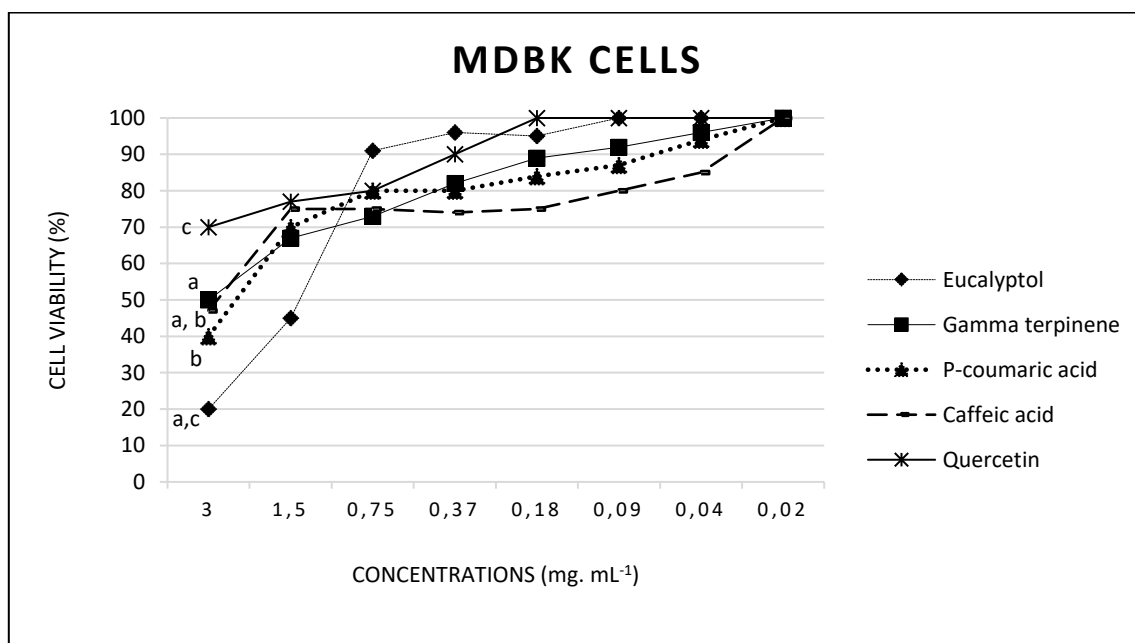


Figure 2. Graphical demonstration of cytotoxic activity of different concentrations of phytochemical compounds in bovine kidney MDBK cells. \* (a, b, c: different letters show statistical difference between treatments,  $p < 0.05$ ).

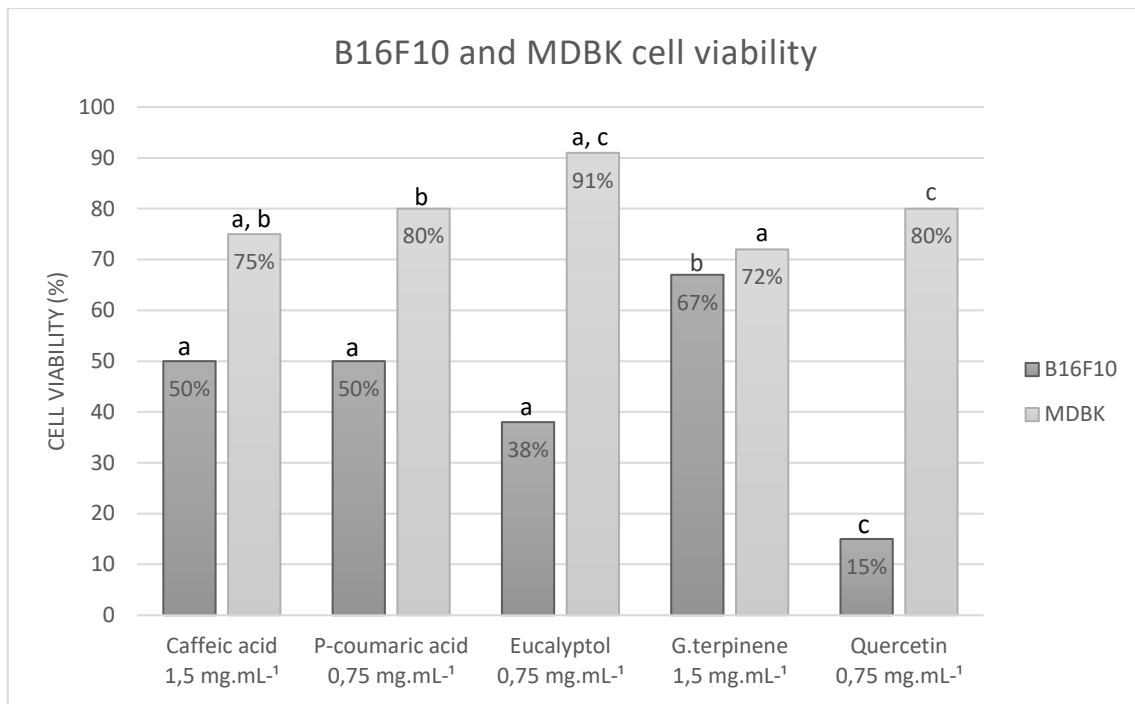


Figure 3. Graphical demonstration of viability of B16F10 and MDBK cells after treatments with caffeic acid, p-coumaric acid, quercetin, eucalyptol and gamma terpinene in different concentrations. \* (a, b, c: different letters show statistical difference between treatments in the same cell line,  $p < 0.05$ )

## 4.2 Artigo 2

### **Efeito citotóxico da associação entre quimioterápico e compostos fitoquímicos em células de melanoma**

GONÇALVES, Helena Piúma; CLEFF, Marlete Brum; HÜBNER, Silvia de Oliveira; CRUZEIRO, Pedro Sica; SILVA, Cristine Cioato; PERERA, Soliane Carra; GUTERRES, Karina Affeldt

Será submetido à revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

## **Efeito citotóxico da associação entre quimioterápico e compostos fitoquímicos em células de melanoma**

### **Cytotoxic effect of the association between chemotherapeutic and phytochemical compounds on melanoma cells**

GONÇALVES, Helena Piúma\*; CLEFF, Marlete Brum; HÜBNER, Silvia de Oliveira; CRUZEIRO, Pedro Sica; SILVA, Cristine Cioato; PERERA, Soliane Carra; GUTERRES, Karina Affeldt

\*Universidade Federal de Pelotas

Campus Universitário, s/n° Capão do Leão, RS/BR. CEP: 96160-000,

E-mail: helenapiuma@gmail.com

#### **RESUMO**

O melanoma é o mais agressivo entre os tipos de câncer de pele, com altas taxas de mortalidade associadas. Este tipo de câncer costuma ser resistente às terapias convencionais, além destas apresentarem muitos efeitos deletérios ao organismo. A carboplatina é um dos principais quimioterápicos utilizados no tratamento do melanoma, e exerce efeito citotóxico através de interferência na síntese de DNA, porém, apresenta efeitos colaterais diversos. Os produtos naturais são objeto de muitas pesquisas que visam encontrar substâncias para o tratamento do câncer com maiores índices terapêuticos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade citotóxica das associações entre carboplatina e os compostos ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol, gama terpineno e quercetina em células de melanoma murino (B16F10). Foram utilizadas sete concentrações (a partir de 1 a 0,03 mg. mL<sup>-1</sup>, em diluições seriadas) da carboplatina, dos compostos isolados ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol, gama terpineno e quercetina, e das associações da carboplatina com os compostos. A combinação entre carboplatina e os compostos fitoquímicos resultou em níveis de citotoxicidade significativamente maiores em relação ao quimioterápico isolado, para as células de melanoma B16F10, com destaque para gama terpineno (1% viabilidade celular) e eucaliptol (2% viabilidade celular), mostrando que estes compostos são promissores para a terapia do melanoma.

Palavras-chave: carboplatina; compostos fitoquímicos; melanoma; quimioterapia

#### **ABSTRACT**

Melanoma is the most aggressive among skin cancers, with associated high mortality rates. This type of cancer usually is resistant to the conventional therapies, besides these present many deleterious effects to the organism. Carboplatin is a major chemotherapeutic agent used in the treatment of melanoma, and exerts a cytotoxic effect through interference in DNA synthesis.

However, it has several side effects. Natural products are the subject of much research aimed at finding substances for the treatment of cancer with higher therapeutic indexes. Therefore, the objective of this study was to evaluate the cytotoxic activity of the associations between carboplatin and the compounds caffeic acid, p-coumaric acid, eucalyptol, gamma terpinene and quercetin in murine melanoma cells (B16F10). Were used seven concentrations (from 1 to 0,03 mg.mL<sup>-1</sup>, in serial dilutions) of carboplatin, of the isolated compounds caffeic acid, p-coumaric acid, eucalyptol, gamma terpinene and quercetin, and carboplatin combinations with the compounds. The combination of carboplatin and phytochemical compounds resulted in significantly higher levels of cytotoxicity than the isolated chemotherapy for B16F10 melanoma cells, with a range of terpinene (1% cell viability) and eucalyptol (2% cell viability), showing that these compounds are promising for melanoma therapy.

Keywords: carboplatin; chemotherapy; melanoma; phytochemical compounds

## Introdução

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018), câncer é a denominação dada ao conjunto de mais de 100 doenças, caracterizadas pelo crescimento desordenado de células malignas invadindo tecidos e órgãos, podendo se espalhar de forma metastática para diversas regiões do corpo, sendo considerada a segunda maior causa de morte por enfermidades no mundo.

O melanoma maligno é a forma mais agressiva de câncer de pele, sendo que em 80% dos casos é responsável pelo óbito do paciente. Felizmente, representa uma pequena fração da casuística oncológica (ALQATHAMA & PRIETO, 2015), visto que em 2018, na espécie humana foram relatados aproximadamente 3% de casos (INCA, 2018). Na espécie canina o melanoma é bastante estudado para uma melhor compreensão da doença, pois os cães servem como modelos experimentais para estudos pré-clínicos em pessoas, tendo assim um benefício mútuo para ambas espécies (HERNANDEZ et al., 2018). Outro fato relevante é o vínculo que os seres humanos têm com seus cães, deixando-os expostos aos mesmos fatores de risco que predisõem ao melanoma (PAOLONI & KHANNA, 2008).

As principais terapias utilizadas para tratamento do melanoma são cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (DOMINGUES et al., 2018).

Dentre os quimioterápicos, a carboplatina tem sido utilizada com frequência no tratamento dos pacientes com melanoma (NISHIYA et al., 2016), ocasionando efeito citotóxico através de interferência na síntese de DNA (BRABEC & KASPARKOVA, 2005), porém, apresenta efeitos adversos como mielossupressão, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (OUN et al., 2018). A toxicidade sistêmica e a resistência são os maiores obstáculos relacionados a quimioterapia, que desafiam a ciência a buscar novas alternativas para o tratamento do câncer. Neste âmbito, os produtos naturais têm recebido ampla atenção, com o objetivo de encontrar moléculas anticâncer com maiores índices terapêuticos (INDAP et al., 2006). Entre os produtos naturais, estão os compostos fenólicos, terpênicos e flavonoides, os quais são oriundos do metabolismo secundário das plantas, e sua diversidade funcional e estrutural desperta a atenção de pesquisadores, em constante e aprimorado processo de estudo (SRIVASTAVA et al., 2016; THEIS & LERDAU, 2003). Extratos vegetais ricos nestes compostos têm as suas propriedades biológicas e terapêuticas reconhecidas, como atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antineoplásica (CLEFF et al., 2010; DE MATOS et al., 2016; GIORDANI, 2017; GUTERRES, 2015; SILVA, 2016; WALLER et al., 2017).

Os compostos de ocorrência natural são considerados agentes promissores para a prevenção e terapia do câncer, devido às suas ações multimodais, atuando de diferentes formas no processo de desenvolvimento do câncer, e por apresentarem toxicidade limitada (HARVEY et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2016). Dentre os compostos com atividade citotóxica reconhecida, podemos citar o ácido cafeico (BOUZAIENE et al., 2015; CHUNG et al., 2004; ROSENDAHL et al., 2015), ácido p-cumárico (CHANG & SHEN, 2014; JAGANATHAN et al., 2013; ANANTHARAJU et al., 2016), eucaliptol (RODENAK KLADNIEW et al., 2017), gama terpineno (DE BRITO PASSOS et al., 2015; FERRAZ et al., 2013) e quercetina (JIANG et al., 2018; RUSSO et al., 2014; SRIVASTAVA et al., 2016). Ainda, a associação entre quimioterápicos convencionais e produtos naturais pode promover efeitos aditivos ou sinérgicos, tornando as células neoplásicas sensíveis a agentes anticancerígenos, aumentando seu efeito terapêutico, e inibindo a quimiorresistência (LEE et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito citotóxico das associações entre carboplatina e os compostos ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol, gama terpineno e quercetina em células de melanoma murino (B16F10).

## Material e métodos

Os compostos fitoquímicos com grau de pureza  $\geq 95\%$  foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich®, USA), bem como o quimioterápico carboplatina (Blau Farmacêutica S/A). Os compostos e suas fórmulas e estruturas químicas estão ilustrados na figura 1.

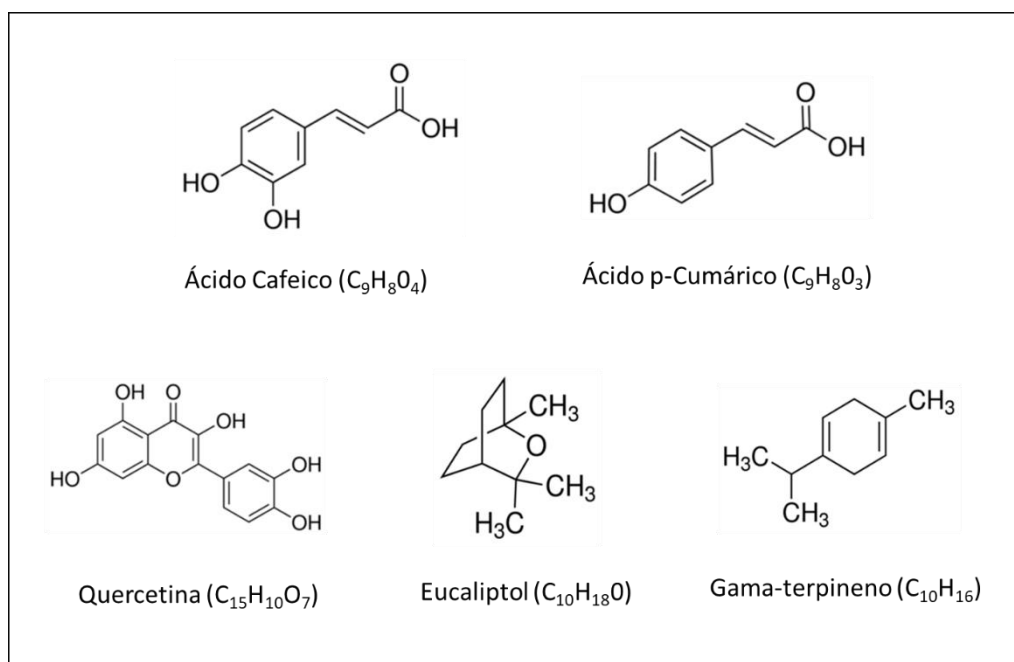


Figura 1. Fórmula estrutural dos compostos fitoquímicos adquiridos comercialmente, testados de forma associada à carboplatina em células B16F10.

A linhagem celular B16F10 (melanoma murino) foi cedida pela Fundação Universidade de Rio Grande. Durante o experimento, as células foram mantidas em meio Eagle modificado Dulbecco (D-MEM, Sigma-Aldrich®), acrescido de antibiótico, antifúngico, glutamina e 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco®), sendo armazenadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida com 5% de  $CO_2$ . Para determinação da citotoxicidade dos compostos e do quimioterápico, foram preparadas soluções estoque de 1 ml de cada, dissolvidos em dimetil-sulfóxido



(DMSO) a 0,5%, e diluídos em D-MEM (Sigma-Aldrich®, USA) e ajustadas a um pH de 7,7. Foram utilizadas sete concentrações da carboplatina isolada (1 mg.mL<sup>-1</sup> a 0,03 mg. mL<sup>-1</sup>) e das associações de carboplatina com os compostos (ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol e gama terpineno), partindo da concentração inicial de 1 mg.mL<sup>-1</sup> a 0,03 mg. mL<sup>-1</sup>, em diluições seriadas.

As células B16F10 foram semeadas em placas de 96 poços, e após a formação do tapete celular foram adicionados os compostos, em triplicata. Após 24 horas de incubação a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, a viabilidade celular foi avaliada segundo Mosmann (1983), utilizando o método do MTT (Sigma-Aldrich®, USA), com posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Células B16F10 tratadas somente com D-MEM foram usadas como controles.

A classificação dos compostos quanto a toxicidade celular baseou-se em Mahmoud e colaboradores (2011), conforme fórmula a seguir. Foi considerada alta citotoxicidade quando a viabilidade celular esteve entre 1 e 50%; moderada citotoxicidade quando a viabilidade esteve entre 51 e 75% e baixa citotoxicidade quando a viabilidade esteve entre 75 e 100%. O percentual de viabilidade celular foi avaliado utilizando a seguinte fórmula:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{m\u00e9dia\ do\ tratamento}{m\u00e9dia\ do\ controle} \times 100$$

## Resultados e discussão

Os graus de toxicidade das associações entre a carboplatina e os compostos fitoquímicos variaram em função das concentrações testadas, onde percebemos que as atividades dos mesmos foram dose-dependentes, sendo que as concentrações mais altas de todas as associações testadas promoveram alta toxicidade para as células de melanoma B16F10. O DMSO foi utilizado para dissolver os compostos fitoquímicos, e foi avaliada a sua toxicidade, onde demonstrou baixa toxicidade para as células B16F10 quando testado nas concentrações de 2 a 0,03%.

A carboplatina isolada, quando avaliada em concentrações a partir de 1 mg.mL<sup>-1</sup> nas células B16F10, apresentou 75-100% de viabilidade celular, ou seja, não foi efetiva, visto que apresentou baixa toxicidade. A associação entre

carboplatina e eucaliptol (figura 2), a partir de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, apresentou alta toxicidade para as células B16F10 nas concentrações de 1 a 0,06 mg.mL<sup>-1</sup>, bem como, a combinação entre carboplatina e gama terpineno (figura 3) promoveu também alta toxicidade nas concentrações de 1 a 0,03 mg.mL<sup>-1</sup>. Os compostos fenólicos ácido cafeico (figura 4) e ácido p-cumárico (figura 5), quando associados à carboplatina, apresentaram também alta toxicidade nas concentrações de 1 a 0,03 mg.mL<sup>-1</sup> (ácido cafeico) e de 1 a 0,06 mg.mL<sup>-1</sup> (ácido p-cumárico). A associação entre quercetina e carboplatina (figura 6) apresentou alta toxicidade nas concentrações de 1 a 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>. Podemos perceber que as associações entre os compostos e a carboplatina exerceram melhor efeito citotóxico em comparação aos compostos isolados, exceto a quercetina, que quando avaliada de forma isolada obteve maior efeito citotóxico em relação à sua associação com o quimioterápico.

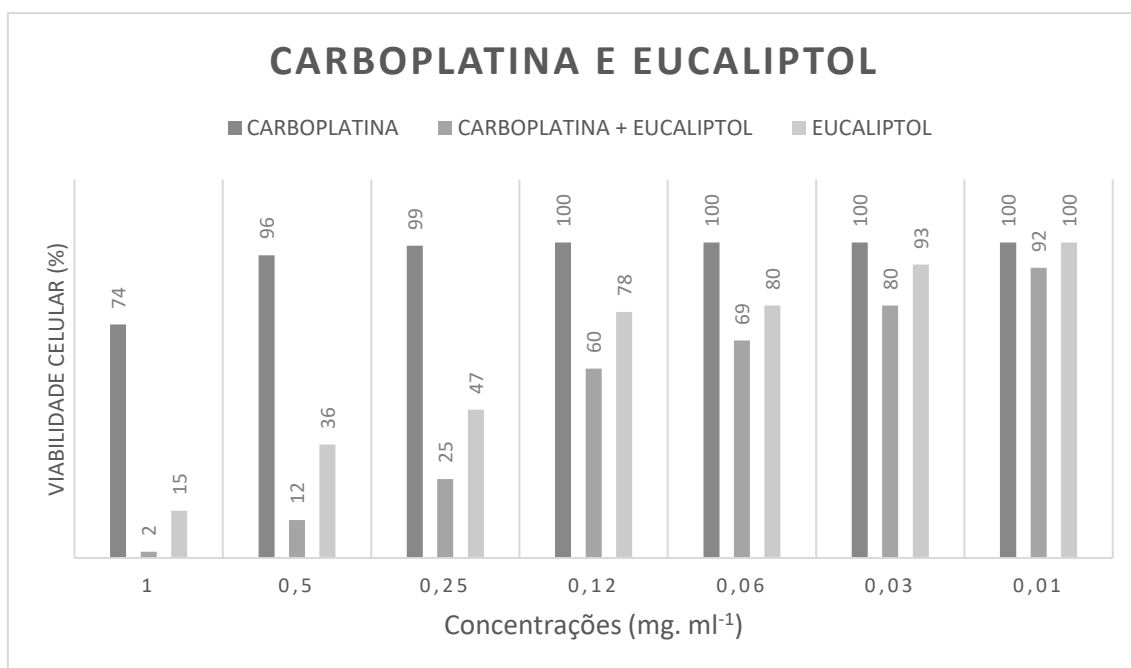


Figura 2. Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto eucaliptol e da associação entre a carboplatina e eucaliptol, a partir de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, em células de melanoma B16F10.

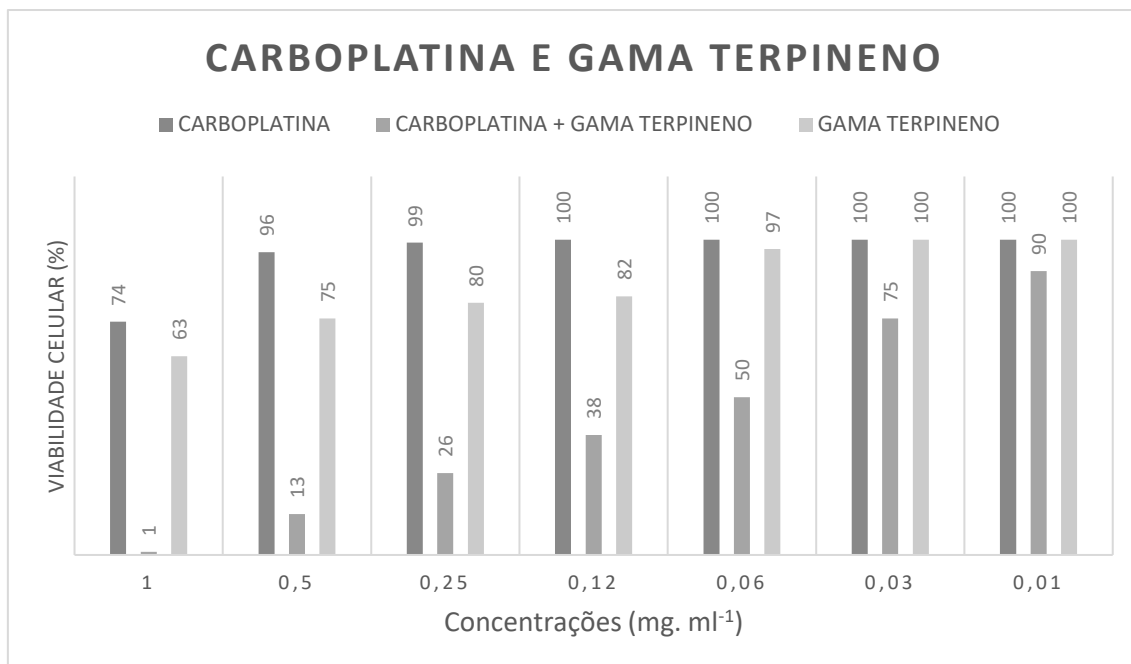


Figura 3. Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto gama terpineno e da associação entre a carboplatina e gama terpineno, a partir de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, em células de melanoma B16F10.

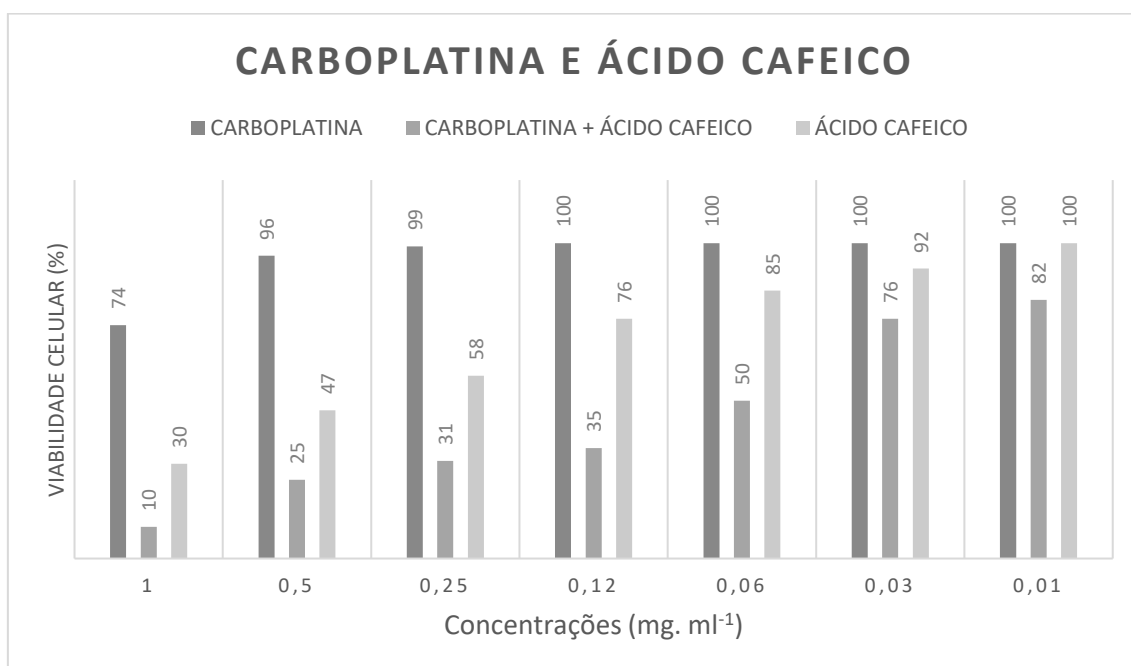


Figura 4. Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto ácido cafeico e da associação entre a carboplatina e ácido cafeico, a partir de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, em células de melanoma B16F10.

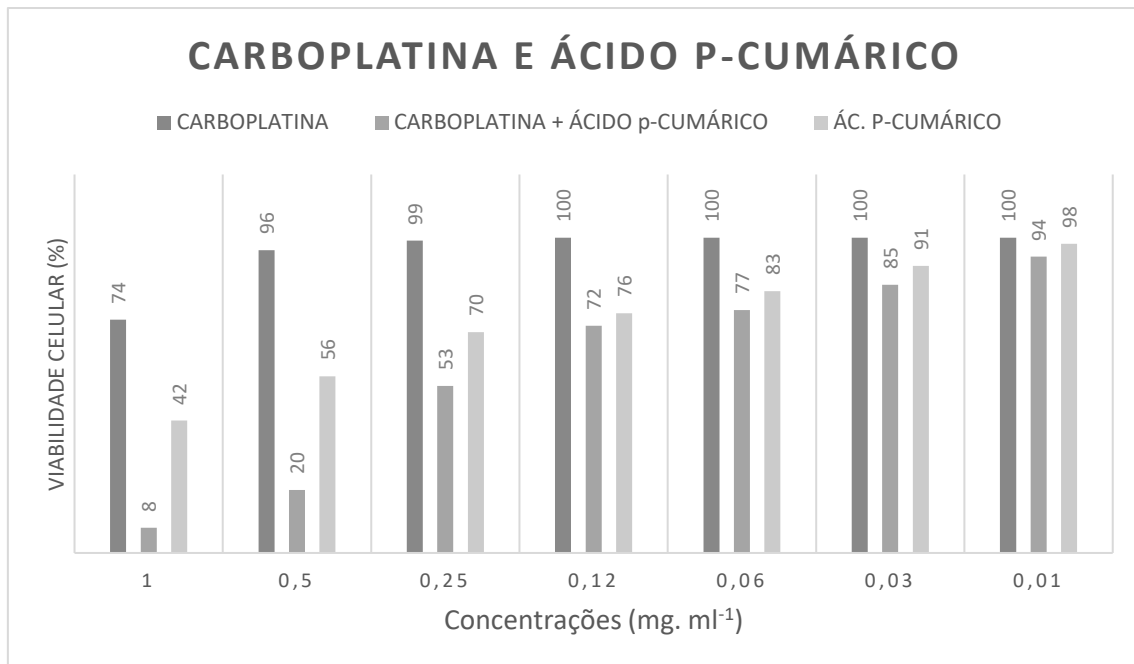


Figura 5. Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto ácido p-cumárico e da associação entre a carboplatina e ácido p-cumárico, a partir de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, em células de melanoma B16F10.

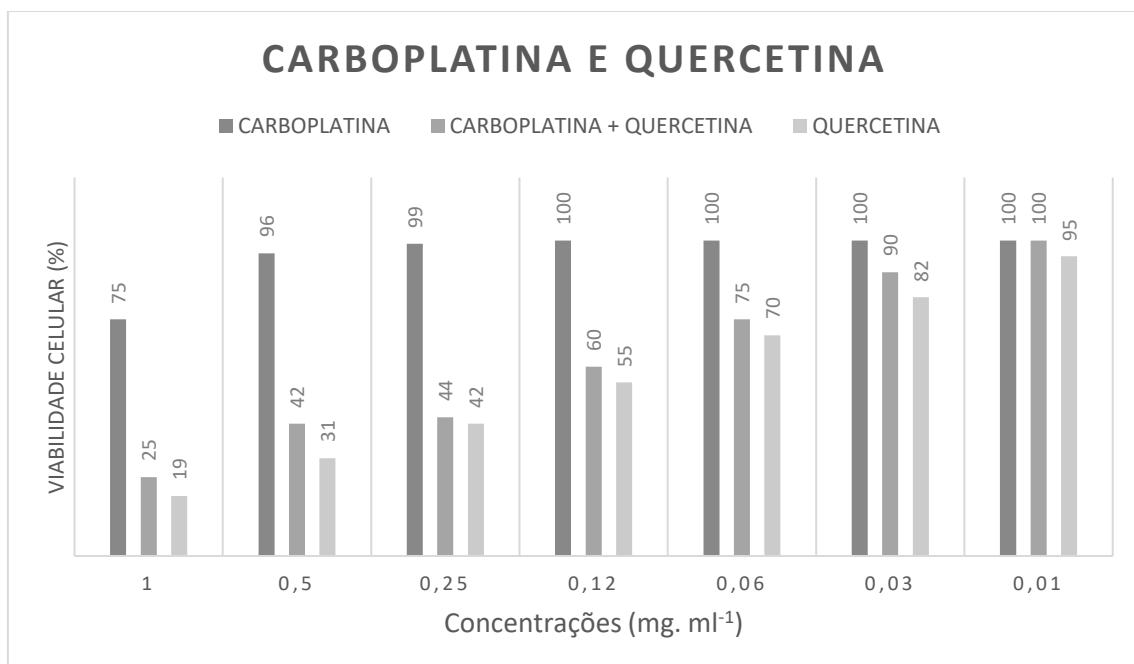


Figura 6. Demonstração gráfica da atividade citotóxica de diferentes concentrações do quimioterápico carboplatina, do composto quercetina e da associação entre a carboplatina e quercetina, a partir de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, em células de melanoma B16F10.

Conforme observado, a atividade citotóxica das associações com o quimioterápico carboplatina podem ser ordenadas em forma crescente, de acordo com sua efetividade e toxicidade para B16F10: gama terpineno > eucaliptol > ácido p-cumarico > ácido cafeico > quercetina.

Os agentes derivados de platina, como cisplatina e carboplatina, são amplamente utilizados para o tratamento do melanoma (HERNANDEZ et al., 2018), entretanto, apresentam efeitos colaterais importantes (OUN et al., 2018). Nos cães, as principais reações decorrentes do uso da carboplatina são a toxicidade hematológica e gastrointestinal (HUME et al., 2009), porém, é a droga de primeira escolha para o tratamento do melanoma nesta espécie (DANK et al., 2014). Quanto aos felinos, a cisplatina é contra indicada, visto que promove grave toxicidade pulmonar (SPUGNINI et al., 2011), portanto, a carboplatina é a alternativa remanescente para o melanoma em gatos. Neste contexto, a terapia combinada é uma estratégia de tratamento eficaz para o tratamento do câncer, pela possibilidade do uso de doses menores, e para driblar a toxicidade e resistência induzida por quimioterápicos, através da utilização de drogas que funcionem por diferentes mecanismos de ação (HEMAISWARYA & DOBLE, 2013). A combinação entre carboplatina e ácido ferrúlico, composto natural polifenólico, mostrou efetividade contra células de leucemia (K562), mostrando que os compostos fitoquímicos podem potencializar a atividade dos quimioterápicos (INDAP et al., 2006).

A quercetina, quando associada à carboplatina, aumenta a atividade antineoplásica da mesma, produzindo maior citotoxicidade às células de melanoma; apesar de que, quando testada de forma isolada, a quercetina mostrou-se ainda mais efetiva. Yuan e colaboradores (2015) observaram que a quercetina, além de induzir apoptose em células de câncer oral, reverteu a resistência destas células à droga quimioterápica vincristina. De forma semelhante, a quercetina modula a resposta de células de câncer de pulmão (LEE et al., 2015) e de câncer de pâncreas (CAO et al., 2015) à gemcitabina. A adição de quercetina ao tratamento com quimioterápicos do grupo das platinas, oxiplatina e cisplatina, promoveu a sensibilização de células de câncer de ovário à ação destas (NESSA et al., 2011). Em um estudo realizado em camundongos com tumores de mama, onde a quercetina foi administrada na dieta, associada a injeções intratumorais de doxorubicina, foi observado efeito sinérgico, visto

que esta combinação induziu a regressão tumoral, além de aumentar a sobrevivência dos camundongos. Cabe ressaltar que a quercetina ou a doxorubicina isoladas não produziram os mesmos efeitos (DU et al., 2010).

Sabe-se que a migração e a invasão celular são mecanismos adotados pelas células tumorais para disseminar-se pelo organismo e escapar dos tratamentos, assim, este seria outro benefício que poderia ser obtido com o uso de compostos fenólicos, já que estes inibem estes mecanismos, sensibilizando as células neoplásicas aos quimioterápicos (ANANTHARAJU et al., 2016). Em nosso estudo, os compostos fenólicos ácido cafeico e ácido p-cumárico incrementaram a atividade da carboplatina, o que está de acordo com outros autores, que trabalhando com estes mesmos compostos, demonstraram interação com o fármaco anticâncer 5-fluorouracil, contra células de câncer cervical humano (HeLa) (HEMAISWARYA & DOBLE, 2013). Outro fármaco utilizado no tratamento de melanoma é a doxorubicina, porém, a aplicação desta tem uso limitado devido a sua cardiotoxicidade, entretanto o ácido p-cumárico demonstrou efeito cardioprotetor em ratos contra o estresse oxidativo induzido pela doxorubicina, mostrando-se proveitoso como adjuvante na terapia do câncer (ABDEL-WAHAB et al., 2003). Alguns autores demonstraram o efeito benéfico do óleo de côco na proteção contra a hepatotoxicidade induzida pelo quimioterápico metotrexato em ratos, o que poderia ser decorrente dos compostos majoritários, ácidos cafeico e p-cumárico (FAMUREWA et al., 2017). Já o composto ácido cafeico isolado incrementou o potencial inibitório do paclitaxel, quimioterápico de primeira linha contra o câncer de pulmão, em comparação ao tratamento com paclitaxel isolado (LIN et al., 2012). De forma semelhante, a atividade quimiossensibilizante de ácido cafeico foi examinada em células de carcinoma mamário humano (MCF-7), resistentes a múltiplos fármacos, e o ácido cafeico reduziu marcadamente a  $CC_{50}$  da doxorubicina (AHN et al., 1997).

A associação da carboplatina com os monoterpenos eucaliptol e gama terpineno obteve maiores índices de toxicidade para células de melanoma em relação aos demais compostos. Os resultados foram devidos provavelmente a interação e sinergismo apresentado por estas moléculas com a carboplatina. Segundo Paduch e colaboradores (2007), estes compostos aumentam a permeabilidade de drogas, melhorando a penetração de outros agentes,

constituindo uma opção para o tratamento de tumores de pele. Ainda, os monoterpenos são liberados lentamente na circulação e facilmente transportados para os tecidos, e apresentam meia-vida longa, por isso, permanecem nos tecidos e células em altas concentrações durante maior tempo (PADUCH et al., 2007), e estes fatores podem ter influência direta sobre a melhor atividade dos monoterpenos nas células de melanoma. De acordo com Ho e colaboradores (2004), o eucaliptol aumenta a permeabilidade transcutânea do tamoxifeno, que é um fármaco utilizado na terapia do câncer mamário, fato que pode ser decorrente à sua maior lipossolubilidade. Os monoterpenos foram identificados no extrato de *Thymus caramanicus* Jalas, demonstrando que a associação com vincristina induziu melhor efeito citotóxico em células de carcinoma mamário (MCF-7), em comparação ao quimioterápico isolado, e o efeito do extrato pode ser atribuído a presença dos terpenos, sendo gama terpineno um de seus principais constituintes (ESMAEILI-MAHANI et al., 2014). Segundo a literatura, a atividade citotóxica dos terpenos está relacionada a concentração e estrutura química, e especialmente, a presença de grupos hidroxila livres e anéis aromáticos (RAO et al., 2010).

## **Conclusões**

A combinação de carboplatina com os compostos fitoquímicos resultou em níveis de citotoxicidade significativamente maiores em relação ao quimioterápico isolado e aos compostos fitoquímicos isolados (exceto a quercetina, que isolada apresenta maior citotoxicidade), para as células de melanoma B16F10, com destaque para gama terpineno e eucaliptol, seguido de ácido p-cumarico, ácido cafeico e quercetina, demonstrando que estes compostos são promissores para a terapia do melanoma.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a UFPel, CAPES, CNPq e FAPERGS.

## Referências

- ABDEL-WAHAB, M. H., EL-MAHDY, M. A., ABD-ELLAH, M. F., HELAL, G. K., KHALIFA, F., HAMADA, F. M. A. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 5, p. 461-465, 2003.
- AHN, C. H.; CHOI, W. C.; KONG, J. Y. Chemosensitizing activity of caffeic acid in multidrug-resistant MCF-7/Dox human breast carcinoma cells. **Anticancer research**, v. 17, n. 3C, p. 1913-1917, 1997.
- ALQATHAMA, A.; PRIETO, J. M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. **Natural product reports**, v. 32, n. 8, p. 1170-1182, 2015.
- ANANTHARAJU, P. G., GOWDA, P. C., VIMALAMBIKE, M. G., MADHUNAPANTULA, S. V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition journal**, v. 15, n. 1, p. 99, 2016.
- BOUZAIENE, N. N., JAZIRI, S. K., KOVACIC, H., CHEKIR-GHEDIRA, L., GHEDIRA, K., LUIS, J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. **European journal of pharmacology**, v. 766, p. 99-105, 2015.
- BRABEC, V., KASPARKOVA, J. Modifications of DNA by platinum complexes: relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. **Drug resistance updates**, v. 8, n. 3, p. 131-146, 2005.
- CAO, C., SUN, L., MO, W., SUN, L., LUO, J., YANG, Z., RAN, Y. Quercetin mediates  $\beta$ -catenin in pancreatic cancer stem-like cells. **Pancreas**, v. 44, n. 8, p. 1334-1339, 2015.
- CHANG, M. Y., SHEN, Y. L. Linalool exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6694-6706, 2014.
- CHUNG, T. W., MOON, S. K., CHANG, Y. C., KO, J. H., LEE, Y. C., CHO, G., KIM, C. H. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 14, p. 1670-1681, 2004.
- CLEFF, M. B., MEINERZ, A. R. M., FARIA, R. O. D., XAVIER, M. O., SANTIN, R., NASCENTE, P. D. S., MEIRELES, M. C. A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1291-1294,2010.
- DANK, G., RASSNICK, K. M., SOKOLOVSKY, Y., GARRETT, L. D., POST, G. S., KITCHELL, B. E., SEGEV, G. 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, 2014.



DE BRITO PASSOS, F. F., LOPES, E. M., DE SOUSA, D. P., ALMEIDA, F. C. Prospecção científica e tecnológica: monoterpeno gama terpineno e atividades farmacológicas. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 2103-2112, 2015.

DE MATOS, C. B., GUTERRES, K. A., GIORDANI, C., MADRID, I. M., CLEFF, M. B., MEIRELES, M. C. A. Germicidal activity of plant extracts of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against *Sporothrix schenckii* complex. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 3, p. 246-252, 2016.

DOMINGUES, B., LOPES, J. M., SOARES, P., PÓPULO, H. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 7, p. 35, 2018.

DU, G., LIN, H., YANG, Y., ZHANG, S., WU, X., WANG, M., HAN, G. Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 7, p. 819-826, 2010.

ESMAEILI-MAHANI, S., FALAHI, F., YAGHOobi, M. M. Proapoptotic and antiproliferative effects of *Thymus caramanicus* on human breast cancer cell line (MCF-7) and its interaction with anticancer drug vincristine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

FAMUREWA, A. C., UFEBE, O. G., EGEDIGWE, C. A., NWANKWO, O. E., OBAJE, G. S. Virgin coconut oil supplementation attenuates acute chemotherapy hepatotoxicity induced by anticancer drug methotrexate via inhibition of oxidative stress in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 437-442, 2017.

FERRAZ, R. P., BOMFIM, D. S., CARVALHO, N. C., SOARES, M. B., DA SILVA, T. B., MACHADO, W. J., BEZERRA, D. P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis Schauer* (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615-621, 2013.

GIORDANI, Claudia. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos**. 2017. 152 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2018/04/Claudia-Giordani.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

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. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2015/05/Karina-Affeldt-Guterres.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

HARVEY, A. L., EDRADA-EBEL, R., QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HEMAISWARYA, S., DOBLE, M. Combination of phenylpropanoids with 5-fluorouracil as anti-cancer agents against human cervical cancer (HeLa) cell line. **Phytomedicine**, v. 20, n. 2, p. 151-158, 2013.

HERNANDEZ, B., ADISSU, H., WEI, B. R., MICHAEL, H., MERLINO, G., SIMPSON, R. Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 394, 2018.

HO, S., CALDER, R. J., THOMAS, C. P., HEARD, C. M. In-vitro transcutaneous delivery of tamoxifen and  $\gamma$ -linolenic acid from borage oil containing ethanol and 1, 8-cineole. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 11, p. 1357-1364, 2004.

HUME, K. R.; JOHNSON, J. L.; WILLIAMS, L. E. Adverse effects of concurrent carboplatin chemotherapy and radiation therapy in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 23, n. 1, p. 24-30, 2009.

INDAP, M. A., RADHIKA, S., MOTIWALE, L., RAO, K. V. K. Inhibitory effect of cinnamoyl compounds against human malignant cell line, **Indian Journal of Experimental Biology**, v.44, p. 216-220, 2006.

**INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA**. Estatísticas de câncer. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

JAGANATHAN, S. K., SUPRIYANTO, E., & MANDAL, M. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 43, p. 7726, 2013.

JIANG, W., ZHANG, H., WU, J., ZHAI, G., LI, Z., LUAN, Y., GARG, S. CuS@MOF-Based Well-Designed Quercetin Delivery System for Chemo-Photothermal Therapy. **ACS applied materials & interfaces**, v. 10, n. 40, p. 34513-34523, 2018.

LEE, S. H., LEE, E. J., MIN, K. H., HUR, G. Y., LEE, S. H., LEE, S. Y., KANG, K. H. Quercetin enhances chemosensitivity to gemcitabine in lung cancer cells by inhibiting heat shock protein 70 expression. **Clinical lung cancer**, v. 16, n. 6, p. e235-e243, 2015.

LIN, C. L., CHEN, R. F., CHEN, J. Y. F., CHU, Y. C., WANG, H. M., CHOU, H. L., CHIU, C. C. Protective effect of caffeic acid on paclitaxel induced anti-proliferation and apoptosis of lung cancer cells involves NF- $\kappa$ B pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 6236-6245, 2012.

MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.O.; LOTUFO, L.V.C.; MAGALHÃES, H.I.F; MORAES, M.O.; LIMA, D.P.; TININIS, A.G.; OLIVEIRA, J.E. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.3, p.456-464, 2011.

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

NESSA, M. U., BEALE, P., CHAN, C., YU, J. Q., HUQ, F. Synergism from combinations of cisplatin and oxaliplatin with quercetin and thymoquinone in human ovarian tumour models. **Anticancer research**, v. 31, n. 11, p. 3789-3797, 2011.

NISHIYA, A., MASSOCO, C., FELIZZOLA, C., PERLMANN, E., BATSCHINSKI, K., TEDARDI, M., ZAIDAN D. M. Comparative aspects of canine melanoma. **Veterinary sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016.

OUN, R., MOUSSA, Y. E., WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645-6653, 2018.

PADUCH, R., KANDEFER-SZERSZEN, M., TRYTEK, M., FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315, 2007.

PAOLONI, M., KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 2, p. 147, 2008.

RAO, A., ZHANG, Y., MUEND, S., RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.

RODENAK KLADNIEW, B. E., CASTRO, M. A., CRESPO, R., & GARCÍA DE BRAVO, M. M. Eucaliptol (1, 8-cineole) inhibe la proliferación de células tumorales mediante arresto del ciclo celular, estrés oxidativo, activación de MAPKs e inhibición de AKT. **Tercera Época**, v.7, n.1, 2017.

ROSENDAHL, A. H., PERKS, C. M., ZENG, L., MARKKULA, A., SIMONSSON, M., ROSE, C., JERNSTROM, H. C. Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor (ER) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) levels in human breast cancer. **Clinical Cancer Research**, p.1748-2014, 2015.

RUSSO, G. L., RUSSO, M., SPAGNUOLO, C., TEDESCO, I., BILOTTO, S., IANNITTI, R., PALUMBO, R. Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. **Advances in nutrition and cancer**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 185-205, 2014.

SRIVASTAVA, S., SOMASAGARA, R. R., HEGDE, M., NISHANA, M., TADI, S. K., SRIVASTAVA, M., RAGHAVAN, S. C. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. **Scientific reports**, v. 6, p. 24049, 2016.

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. 90f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2016/03/Cristine-Cioato-da-Silva.pdf>>. Acesso em: 5 nov. 2018.

SPUGNINI, E. P., RENAUD, S. M., BUGLIONI, S., CAROCCI, F., DRAGONETTI, E., MURACE, R., CARDELLI, P., VINCENZI, B., BALDI, A., CITRO, G. Electrochemotherapy with cisplatin enhances local control after surgical ablation of fibrosarcoma in cats: an approach to improve the therapeutic index of highly toxic chemotherapy drugs. **Journal of translational medicine**, v. 9, n. 1, p. 152, 2011.

THEIS, N., LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. S3, p. S93-S102, 2003.

WALLER, S. B., CLEFF, M. B., SERRA, E. F., SILVA, A. L., DOS REIS GOMES, A., DE MELLO, J. R. B., MEIRELES, M. C. A. Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. **Microbial pathogenesis**, v. 104, p. 232-237, 2017.

YUAN, Z., WANG, H., HU, Z., HUANG, Y., YAO, F., SUN, S., WU, B. Quercetin inhibits proliferation and drug resistance in KB/VCR oral cancer cells and enhances its sensitivity to vincristine. **Nutrition and cancer**, v. 67, n. 1, p. 126-136, 2015.

## 5 Considerações Finais

- A cultura de células de linhagem de melanoma murino B16F10 revelou-se um ensaio sensível ao teste do efeito de compostos fitoquímicos sobre a viabilidade celular.
- Todos os compostos fitoquímicos (ácido cafeico, ácido p-cumárico, eucaliptol, gama terpineno e quercetina) exerceram efeito citotóxico nas células B16F10, com melhor desempenho para quercetina.
- Os compostos fitoquímicos apresentaram toxicidade dose dependente para as células MDBK, sendo que os mesmos podem ser assim ordenados, de forma crescente, de acordo com sua toxicidade para este tipo celular: gama terpineno > quercetina > eucaliptol > ácido p-cumárico > ácido cafeico.
- Os compostos fitoquímicos foram mais tóxicos para as células de melanoma do que para as células renais.
- As associações entre carboplatina e os compostos fitoquímicos apresentaram alta toxicidade para as células B16F10, sendo que gama terpineno e eucaliptol foram os que apresentaram maior efetividade, seguidos de ácido p-cumarico, ácido cafeico e quercetina.
- Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação destes compostos fitoquímicos responsáveis pelas atividades biológicas aqui apresentadas e o seu potencial como fonte de substâncias a serem empregadas contra o câncer, em especial o melanoma.
- Como sequência deste estudo, experimentos *in vivo* são interessantes para avaliar a biodisponibilidade destes compostos no organismo.

## Referências

ABDEL-WAHAB, M. H., EL-MAHDY, M. A., ABD-ELLAH, M. F., HELAL, G. K., KHALIFA, F., HAMADA, F. M. A. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 5, p. 461-465, 2003.

ADAMS, V. J. Approach to the companion animal cancer patient: current therapies. **The Veterinary Nurse**, v. 8, n. 1, p. 30-36, 2017.

AHN, C. H.; CHOI, W. C.; KONG, J. Y. Chemosensitizing activity of caffeic acid in multidrug-resistant MCF-7/Dox human breast carcinoma cells. **Anticancer research**, v. 17, n. 3C, p. 1913-1917, 1997.

ALQATHAMA, A.; PRIETO, J. M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. **Natural product reports**, v. 32, n. 8, p. 1170-1182, 2015.

ANANTHARAJU, P. G., GOWDA, P. C., VIMALAMBIKE, M. G., MADHUNAPANTULA, S. V. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition journal**, v. 15, n. 1, p. 99, 2016.

ARAS, A., KHOKHAR, A. R., QURESHI, M. Z., SILVA, M. F., SOBCZAK-KUPIEC, A., PINEDA, E. A., FAROOQI, A. A. Targeting cancer with nano-bullets: curcumin, EGCG, resveratrol and quercetin on flying carpets. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 9, p. 3865-71, 2014.

ASANOVA, Z. K., SULEIMENOV, E. M., ATAZHANOVA, G. A., DEMBITSKII, A. D., PAK, R. N., DAR, A., ADEKENOV, S. M. Biological activity of 1, 8-cineole from levant wormwood. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 37, n. 1, p. 28-30, 2003.

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

BERWICK, M. et al. **Melanoma epidemiology and prevention**. In Melanoma. Springer, Cham, 2016. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-22539-5\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-22539-5_2)>. Acesso em: 03 jan. 2019.

BERGMAN, P.J. et al. Melanoma. In **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Elsevier/Saunders: St. Louis, MO, USA, 2013. Disponível em: <[https://books.google.com/books?hl=ptR&lr=&id=nYYlauGf0D4C&oi=fnd&pg=PP1&q=BERGMAN,+P.+J.%3B+KENT,+M.+S.%3B+FARESE,+J.+P.+Melanoma.+In:+WIT+HROW,+S.+J.%3B+VAIL,+D.+M.%3B+PAGE,+R.+L.+Withrow+%26+MacEwen%E2%80%99s+%E2%80%93+Small+Animal+Clinical+Oncology.+Missouri:+Elsevier,+2013.+Cap.19,+p.321-331.&ots=pMWG6CMnrZ&sig=2Zjc98jIFduvavqLXia7Efp05\\_c](https://books.google.com/books?hl=ptR&lr=&id=nYYlauGf0D4C&oi=fnd&pg=PP1&q=BERGMAN,+P.+J.%3B+KENT,+M.+S.%3B+FARESE,+J.+P.+Melanoma.+In:+WIT+HROW,+S.+J.%3B+VAIL,+D.+M.%3B+PAGE,+R.+L.+Withrow+%26+MacEwen%E2%80%99s+%E2%80%93+Small+Animal+Clinical+Oncology.+Missouri:+Elsevier,+2013.+Cap.19,+p.321-331.&ots=pMWG6CMnrZ&sig=2Zjc98jIFduvavqLXia7Efp05_c)>. Acesso em: 15 jan. 2019.

BLANK, Daiane. **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.

BLANK, D. E.; ALVES, G. H.; FREITAG, R. A.; CORREA, R. A.; DE OLIVEIRA HUBNER, S.; CLEFF, M. B. composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis*. **Science And Animal Health**, v. 4, n. 2, p. 117-130, 2017.

BONES, V. C.; MOLENTO, C. F. M. Alternatives to the use of laboratory animals in Brazil. **Veterinaria em foco**, v. 10, n. 1, p. 103-112, 2012.

BOURGOU, S., PICHETTE, A., MARZOUK, B., LEGAULT, J. Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 2, p. 210-216, 2010.

BOUZAIENE, N. N., JAZIRI, S. K., KOVACIC, H., CHEKIR-GHEDIRA, L., GHEDIRA, K., LUIS, J. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. **European journal of pharmacology**, v. 766, p. 99-105, 2015.

BRABEC, V., KASPARKOVA, J. Modifications of DNA by platinum complexes: relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. **Drug resistance updates**, v. 8, n. 3, p. 131-146, 2005.

BRANDÃO, L. G. Tratamento cirúrgico do carcinoma epidermoide da cavidade oral e orofaringe no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP): perfil dos

pacientes tratados e resultados oncológicos iniciais. **Revista Brasileira Cirurgia Cabeça Pescoço**, v. 41, n. 2, p. 53-57, 2012.

CAO, C., SUN, L., MO, W., SUN, L., LUO, J., YANG, Z., RAN, Y. Quercetin mediates  $\beta$ -catenin in pancreatic cancer stem-like cells. **Pancreas**, v. 44, n. 8, p. 1334-1339, 2015.

CAPELLA, Gabriela de Almeida. **Ambiente como fonte de formas parasitárias e potencial de extratos vegetais da família Lamiaceae contra parasitos do gênero Toxocara**. 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2018/01/Gabriela-de-Almeida-Capella.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

CHA, J. D., KIM, Y. H., & KIM, J. Y. Essential oil and 1, 8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 185-191, 2010.

CHANG, J. H., LAI, S. L., CHEN, W. S., HUNG, W. Y., CHOW, J. M., HSIAO, M., CHIEN, M. H. Quercetin suppresses the metastatic ability of lung cancer through inhibiting Snail-dependent Akt activation and Snail-independent ADAM9 expression pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 10, p. 1746-1758, 2017.

CHANG, M. Y., SHEN, Y. L. Linalool exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6694-6706, 2014.

CHUNG, T. W., MOON, S. K., CHANG, Y. C., KO, J. H., LEE, Y. C., CHO, G., KIM, C. H. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 14, p. 1670-1681, 2004.

CLEFF, M. B., MEINERZ, A. R. M., FARIA, R. O. D., XAVIER, M. O., SANTIN, R., NASCENTE, P. D. S., MEIRELES, M. C. A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010.

CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.



CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. **Natural Products as Sources of Anticancer Agents**: Current Approaches and Perspectives. In: *Natural Products as Source of Molecules with Therapeutic Potential*. Springer, Cham, 2018. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-00545-0\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-00545-0_8)>. Acesso em: 07 jan. 2019.

CUNHA, S. D. S., HOLGUIN, P. G., CORGOZINHO, K. B., DE AZEVEDO, S. C. S., DE CARVALHO, L. A. V., & FERREIRA, A. M. R. Radiation therapy as an adjuvant therapy for the treatment of oral melanoma in a dog. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, 2013.

DA SILVA, C. F. N., MELO, G. P., BERNARDES, S. S., CECCHINI, A. A. Experimental models of *in vivo* murine melanoma. **Biosaúde**, v. 15, n. 2, p. 73-80, 2013.

DANK, G., RASSNICK, K. M., SOKOLOVSKY, Y., GARRETT, L. D., POST, G. S., KITCHELL, B. E., SEGEV, G. 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, 2014.

DE BRITO PASSOS, F. F., LOPES, E. M., DE SOUSA, D. P., ALMEIDA, F. C. Prospecção científica e tecnológica: monoterpeno gama terpineno e atividades farmacológicas. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 2103-2112, 2015.

DE MATOS, C. B., GUTERRES, K. A., GIORDANI, C., MADRID, I. M., CLEFF, M. B., MEIRELES, M. C. A. Germicidal activity of plant extracts of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against *Sporothrix schenckii* complex. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 3, p. 246-252, 2016.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M., SARTORATTO, A., MAIA, S., DE NORONHA, B. H. L., PADILHA DE PAULA, J., NAKASHIMA, T., KANUNFRE, C. C. In vitro cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

DOMINGUES, B., LOPES, J. M., SOARES, P., PÓPULO, H. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 7, p. 35, 2018.

DU, G., LIN, H., YANG, Y., ZHANG, S., WU, X., WANG, M., HAN, G. Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces

rejection of established breast cancer in mice. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 7, p. 819-826, 2010.

ELANSARY, H. O.; MAHMOUD, E. A. Egyptian herbal tea infusions' antioxidants and their antiproliferative and cytotoxic activities against cancer cells. **Natural product research**, v. 29, n. 5, p. 474-479, 2015.

ESMAEILI-MAHANI, S., FALAHI, F., YAGHOUBI, M. M. Proapoptotic and antiproliferative effects of *Thymus caramanicus* on human breast cancer cell line (MCF-7) and its interaction with anticancer drug vincristine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

FAMUREWA, A. C., UFEBE, O. G., EGEDIGWE, C. A., NWANKWO, O. E., OBAJE, G. S. Virgin coconut oil supplementation attenuates acute chemotherapy hepatotoxicity induced by anticancer drug methotrexate via inhibition of oxidative stress in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 437-442, 2017.

FAROOQI, A. A., JABEEN, S., ATTAR, R., YAYLIM, I., XU, B. Quercetin-mediated regulation of signal transduction cascades and microRNAs: Natural weapon against cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 12, p. 9664-9674, 2018.

FERRAZ, R. P., BOMFIM, D. S., CARVALHO, N. C., SOARES, M. B., DA SILVA, T. B., MACHADO, W. J., BEZERRA, D. P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615-621, 2013.

GIORDANI, Claudia. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos**. 2017. 152 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2018/04/Claudia-Giordani.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

GRONDONA, E.; GATTI, G.; LÓPEZ, A. G.; SÁNCHEZ, L. R., PESSAH, O., PONCE, A. A. Bio-efficacy of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* Lamiaceae. Ssp. *Hirtum*). **Plant Food and Human Nutrition**, v. 69, n. 4, p. 351-357, 2014.

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. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2015/05/Karina-Affeldt-Guterres.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

GYLES, Carlton. A new approach to cancer. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 56, n. 4, p. 321, 2015.

HARRIS, Z., DONOVAN, M. G., BRANCO, G. M., LIMESAND, K. H., BURD, R. Quercetin as an emerging anti-melanoma agent: a four-focus area therapeutic development strategy. **Frontiers in nutrition**, v. 3, p. 48, 2016.

HARVEY, A. L., EDRADA-EBEL, R., QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HEMAISWARYA, S., DOBLE, M. Combination of phenylpropanoids with 5-fluorouracil as anti-cancer agents against human cervical cancer (HeLa) cell line. **Phytomedicine**, v. 20, n. 2, p. 151-158, 2013.

HERNANDEZ, B., ADISSU, H., WEI, B. R., MICHAEL, H., MERLINO, G., SIMPSON, R. Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 394, 2018.

HO, S., CALDER, R. J., THOMAS, C. P., HEARD, C. M. In-vitro transcutaneous delivery of tamoxifen and  $\gamma$ -linolenic acid from borage oil containing ethanol and 1, 8-cineole. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 11, p. 1357-1364, 2004.

HUME, K. R.; JOHNSON, J. L.; WILLIAMS, L. E. Adverse effects of concurrent carboplatin chemotherapy and radiation therapy in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 23, n. 1, p. 24-30, 2009.

INDAP, M. A., RADHIKA, S., MOTIWALE, L., RAO, K. V. K. Inhibitory effect of cinnamoyl compounds against human malignant cell line, **Indian Journal of Experimental Biology**, v.44, p. 216-220, 2006.

**INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA**. Estatísticas de câncer. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: jan. 2019.

JAGANATHAN, S. K., SUPRIYANTO, E., & MANDAL, M. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 43, p. 7726, 2013.

JIANG, W., ZHANG, H., WU, J., ZHAI, G., LI, Z., LUAN, Y., GARG, S. CuS@ MOF-Based Well-Designed Quercetin Delivery System for Chemo-Photothermal Therapy. **ACS applied materials & interfaces**, v. 10, n. 40, p. 34513-34523, 2018.

JIN, G. B.; HONG, T.; INOUE, S.; URANO, T.; CHO, S.; OTSU, K.; KITAHARA, M.; OUCHI, Y.; CYONG, J. C. Augmentation of immune cell activity against tumor cells by *Rauwolfia radix*. **Journal of ethnopharmacology**, v.81, n. 3, p. 365-372, 2002.

JUNG, J. E., KIM, H. S., LEE, C. S., PARK, D. H., KIM, Y. N., LEE, M. J., CHUNG, M. H. Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 8, p. 1780-1787, 2007.

KANG, N. J., LEE, K. W., SHIN, B. J., JUNG, S. K., HWANG, M. K., BODE, A. M., DONG, Z. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 321-330, 2008.

KUMAR, S., PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.

LEE, S. H., LEE, E. J., MIN, K. H., HUR, G. Y., LEE, S. H., LEE, S. Y., KANG, K. H. Quercetin enhances chemosensitivity to gemcitabine in lung cancer cells by inhibiting heat shock protein 70 expression. **Clinical lung cancer**, v. 16, n. 6, p. e235-e243, 2015.

LIN, C. L., CHEN, R. F., CHEN, J. Y. F., CHU, Y. C., WANG, H. M., CHOU, H. L., CHIU, C. C. Protective effect of caffeic acid on paclitaxel induced anti-proliferation and apoptosis of lung cancer cells involves NF- $\kappa$ B pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 6236-6245, 2012.

LOIZZO, M. R., TUNDIS, R., MENICHINI, F., SAAB, A. M., STATTI, G. A., MENICHINI, F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Proliferation**, v. 41, n. 6, p. 1002-1012, 2008.

MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.O.; LOTUFO, L.V.C.; MAGALHÃES, H.I.F; MORAES, M.O.; LIMA, D.P.; TININIS, A.G.; OLIVEIRA, J.E. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.3, p.456-464, 2011.

MOORE, J., YOUSEF, M., TSIANI, E. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. **Nutrients**, v. 8, n. 11, p. 731, 2016.

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

NAGAO, T., ABE, F., OKABE, H. Antiproliferative constituents in the plants 7. Leaves of *Clerodendron bungei* and leaves and bark of *C. trichotomum*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 11, p. 1338-1341, 2001.

NAM, J. S., SHARMA, A. R., NGUYEN, L. T., CHAKRABORTY, C., SHARMA, G., LEE, S. S. Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 108, 2016.

**NATIONAL CANINE CANCER FOUNDATION.** Why Do Some Dogs Get Cancer More Than Others?. 2015. Disponível em: <<https://wearethecure.org/why-do-some-dogs-get-cancer-more-than-others/>> Acesso em: 25 de janeiro 2019, 10:40.

NESSA, M. U., BEALE, P., CHAN, C., YU, J. Q., HUQ, F. Synergism from combinations of cisplatin and oxaliplatin with quercetin and thymoquinone in human ovarian tumour models. **Anticancer research**, v. 31, n. 11, p. 3789-3797, 2011.

NISHIYA, A., MASSOCO, C., FELIZZOLA, C., PERLMANN, E., BATSCHINSKI, K., TEDARDI, M., ZAIDAN D. M. Comparative aspects of canine melanoma. **Veterinary sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016.

OUN, R., MOUSSA, Y. E., WHEATE, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. **Dalton Transactions**, v. 47, n. 19, p. 6645-6653, 2018.

PADUCH, R., KANDEFER-SZERSZEN, M., TRYTEK, M., FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315, 2007.

PAOLONI, M., KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 2, p. 147, 2008.

PÉREZ-SANCHEZ, A., BARRAJÓN-CATALÁN, E., RUÍZ-TORRES, V., AGULLÓ-CHAZARRA, L., HERRANZ-LOPEZ, M., MICOL, V. PO-025 Antiproliferative effects of rosemary (*rosmarinus officinalis*, L.) extract in colon cancer cells lines. **ESMO Open Cancer Horizons**, v. 3, n. 2, 2018.

RAFIQ, R. A., QUADRI, A., NAZIR, L. A., PEERZADA, K., GANAI, B. A., TASDUQ, S. A. A potent inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen activated protein (MAP) kinase signalling, quercetin (3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflavone) promotes cell death in ultraviolet (UV)-B-irradiated B16F10 melanoma cells. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131253, 2015.

RAO, A., ZHANG, Y., MUEND, S., RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.

RAVISHANKAR, D., RAJORA, A. K., GRECO, F., OSBORN, H. M. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 12, p. 2821-2831, 2013.

RODENAK KŁADNIEW, B. E., CASTRO, M. A., CRESPO, R., & GARCÍA DE BRAVO, M. M. Eucaliptol (1, 8-cineole) inhibe la proliferación de células tumorales mediante arresto del ciclo celular, estrés oxidativo, activación de MAPKs e inhibición de AKT. **Tercera Época**, v.7, n.1, 2017.

ROSENDAHL, A. H., PERKS, C. M., ZENG, L., MARKKULA, A., SIMONSSON, M., ROSE, C., JERNSTROM, H. C. Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor (ER) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) levels in human breast cancer. **Clinical Cancer Research**, p.1748-2014, 2015.

RUSSO, A., LOMBARDO, L., TRONCOSO, N., GARBARINO, J., CARDILE, V. *Rosmarinus officinalis* L. extract inhibits human melanoma cell growth. **Planta Medica**, v. 75, n. 09, p.59, 2009.

RUSSO, G. L., RUSSO, M., SPAGNUOLO, C., TEDESCO, I., BILOTTO, S., IANNITTI, R., PALUMBO, R. Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. **Advances in nutrition and cancer**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 185-205, 2014.

RUSSO, M., SPAGNUOLO, C., TEDESCO, I., BILOTTO, S., RUSSO, G. L. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 6-15, 2012.

RZEPECKA-STOJKO, A., KABAŁA-DZIK, A., MOŹDZIERZ, A., KUBINA, R., WOJTYCZKA, R. D., STOJKO, R., STOJKO, J. Caffeic acid phenethyl ester and ethanol extract of propolis induce the complementary cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9242-9262, 2015.

SAMPATH, S., SUBRAMANI, S., JANARDHANAM, S., SUBRAMANI, P., YUVARAJ, A., CHELLAN, R. Bioactive compound 1, 8-Cineole selectively induces G2/M arrest in A431 cells through the upregulation of the p53 signaling pathway and molecular docking studies. **Phytomedicine**, 2018.

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. 90f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2016/03/Cristine-Cioato-da-Silva.pdf>>. Acesso em: nov. 2018.

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: Biological Sciences**, v. 370, n. 1673, p. 20140231, 2015.

SHAILASREE, S., VENKATARAMANA, M., NIRANJANA, S. R., PRAKASH, H. S. Cytotoxic effect of p-coumaric acid on neuroblastoma, N2a cell via generation of reactive oxygen species leading to dysfunction of mitochondria inducing apoptosis and autophagy. **Molecular neurobiology**, v. 51, n. 1, p. 119-130, 2015.

SIMPSON, R. M., BASTIAN, B. C., MICHAEL, H. T., WEBSTER, J. D., PRASAD, M. L., CONWAY, C. M., SMEDLEY, R. C. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. **Pigment cell & melanoma research**, v. 27, n. 1, p. 37-47, 2014.

SPUGNINI, E. P., RENAUD, S. M., BUGLIONI, S., CAROCCI, F., DRAGONETTI, E., MURACE, R., CARDELLI, P., VINCENZI, B., BALDI, A., CITRO, G.

Electrochemotherapy with cisplatin enhances local control after surgical ablation of fibrosarcoma in cats: an approach to improve the therapeutic index of highly toxic chemotherapy drugs. **Journal of translational medicine**, v. 9, n. 1, p. 152, 2011.

SRIVASTAVA, S., SOMASAGARA, R. R., HEGDE, M., NISHANA, M., TADI, S. K., SRIVASTAVA, M., RAGHAVAN, S. C. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. **Scientific reports**, v. 6, p. 24049, 2016.

SRIVASTAVA, N. S.; SRIVASTAVA, R. A. K. Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. **Phytomedicine**, v. 52, p. 117-128, 2019.

SOBRAL, M. V., XAVIER, A. L., LIMA, T. C., DE SOUSA, D. P. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

THEIS, N., LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. S3, p. S93-S102, 2003.

VARGAS, A. J., SITTADJODY, S., THANGASAMY, T., MENDOZA, E. E., LIMESAND, K. H., BURD, R. Exploiting tyrosinase expression and activity in melanocytic tumors: quercetin and the central role of p53. **Integrative cancer therapies**, v. 10, n. 4, p. 328-340, 2011.

VIANA, A. R., MARZARI, J., WERGUTZ, J., KRAUSE, L. M. F. Produtos bioativos na prevenção e no tratamento do câncer, em especial o melanoma. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 18, n. 3, p. 511-528, 2017.

WAINSTEIN, A. J., BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 31, n. 3, p. 204-214, 2018.

WALLER, S. B., CLEFF, M. B., SERRA, E. F., SILVA, A. L., DOS REIS GOMES, A., DE MELLO, J. R. B., MEIRELES, M. C. A. Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. **Microbial pathogenesis**, v. 104, p. 232-237, 2017.



WANG, W., LI, N., LUO, M., ZU, Y., & EFFERTH, T. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**, v. 17, n. 3, 2012.

YANG, A. S., CHAPMAN, P. B. The history and future of chemotherapy for melanoma. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 23, n. 3, p. 583-597, 2009.

YANG, Y., WANG, T., CHEN, D., MA, Q., ZHENG, Y., LIAO, S., ZHANG, J. Quercetin preferentially induces apoptosis in KRAS-mutant colorectal cancer cells via JNK signaling pathways. **Cell biology international**, v. 43, n. 2, p. 117-124, 2019.

YUAN, Z., WANG, H., HU, Z., HUANG, Y., YAO, F., SUN, S., WU, B. Quercetin inhibits proliferation and drug resistance in KB/VCR oral cancer cells and enhances its sensitivity to vincristine. **Nutrition and cancer**, v. 67, n. 1, p. 126-136, 2015.

YOUL KIM, S., PARK, K. S., JEONG, K. C. Cancer sensitizer comprising chlorogenic acid. **U.S. Patent Application**, n. 12/740, p. 978, 2010.