



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ALÉRCIO DA SILVA SOUTILHA

POTENCIAL CITOTÓXICO DE *Tillandsia recurvata* (L.) L. EM CÉLULAS DE
MELANOMA

DOURADOS – MS
2022

ALÉRCIO DA SILVA SOUTILHA

**POTENCIAL CITOTÓXICO DE *Tillandsia recurvata* (L.) L. EM CÉLULAS DE
MELANOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kely de Picoli Souza

Coorientador: Prof. Me. Helder Freitas do Santos

**DOURADOS – MS
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S726p Soutilha, Alécio Da Silva

Potencial citotóxico de *Tillandsia recurvata* (L.) L. em células de melanoma [recurso eletrônico]

/ Alécio Da Silva Soutilha. -- 2022.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Kely de Picoli Souza.

Coorientador: Helder Freitas dos Santos.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2022.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Câncer de pele. 2. Cravo-do-mato. 3. Bios prospecção. 4. Terpenos. I. Souza, Kely De Picoli.
II. Santos, Helder Freitas Dos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

ALÉRCIO DA SILVA SOUTILHA

POTENCIAL CITOTÓXICO DE *Tillandsia recurvata* (L.) L. EM CÉLULAS DE MELANOMA

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Kely de Picoli Souza

Coorientador: Prof^o. Me. Helder Freitas dos Santos

Área de Concentração: Biotecnologia

Aprovado em: 28 de outubro de 2022

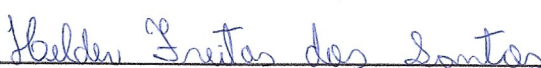
BANCA EXAMINADORA



PROF^a. DR^a. KELY DE PICOLI SOUZA
Presidente



PROF^a. DR^a. PAOLA DOS SANTOS DA ROCHA
Membro



PROF^o. Me. HELDER FREITAS DOS SANTOS
Membro

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho, que foram considerados como desafios para a construção da minha carreira científica.

Aos meus pais, Maria do Carmo Bispo da Silva Soutilha e Laerço da Silva Soutilha e, irmãos, Laércio da Silva Soutilha, Márcio Tadeu Soutilha e Marcelo Tadeu Soutilha, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava a realização deste trabalho.

Em nome da minha irmã, parceira de trabalho e de vida Natália Guedes Jorge, eu agradeço todos os meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho. A nossa caminhada foi linda até agora e o infinito do céu será o nosso limite.

A Prof^a Dr^a Paola dos Santos da Rocha, por ter guiado o início da minha jornada científica no Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção aplicados ao Metabolismo (GEBBAM) e por ter sido minha primeira orientadora na graduação que forneceu todo suporte, ajuda, conselhos e amizade durante todo esse tempo.

A magnífica e admirável Prof^a Dr^a Kely de Picoli Souza, por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e eficiência, demonstrando que o caminho para produzir ciência de qualidade está na força de um grupo unido e determinado seguido por muito estudo e dedicação. Ao grande pesquisador e professor Dr. Edson Lucas dos Santos, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o meu aprendizado. Ambos são exemplos de pesquisadores e líderes.

Ao meu coorientador Helder Freitas dos Santos, por toda ajuda durante a construção desse trabalho e por todos os ensinamentos, conselhos, orientações, discussões e momentos de alegria vividos até hoje. Você, assim como os demais, foi essencial para a realização desse sonho.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq, Fundect, UFGD, FINEP, que proporcionaram infraestrutura ao GEBBAM para realização deste estudo, bem como dos ensaios futuros desta pesquisa.

Ao GEBBAM, por ser o local onde estou desenvolvendo minhas habilidades científicas e pessoais e transformando um grande sonho em realidade! Sou muito grato a este grupo e espero contribuir significativamente para consolidar o GEBBAM como referência de pesquisa mundial. Por fim, e não menos importante, a todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Fatores que podem promover a transformação de células normais em células cancerígenas.

Figura 2. Etapas do processo metastático.

Figura 3. Componentes celulares presentes na epiderme, em destaque, os melanócitos.

Figura 4. Regra do ABCD para diagnóstico de melanoma.

Figura 5. Distribuição geográfica de *Tillandsia* no território brasileiro.

Figura 6. *Tillandsia recurvata*: planta aérea em 1: árvore, 1A: folha, 1B: flor; 2 alvenarias, 2ª: folha, 2B: flor; 3: fio de eletricidade

Figura 7. Viabilidade de células de melanoma murino B16F10-Nex2 tratadas com diferentes concentrações do Extrato Diclorometano:metanol (95:5) de *Tillandsia recurvata* durante 24 e 48h. 0: Controle do solvente, DMSO a 0,1%. Os resultados de três experimentos independentes em triplicata foram expressos como média $\pm$ SEM. *** vs. Controle 24 h; ### vs. Controle 48 h com $P < 0,001$.

Figura 8. Viabilidade de células de melanoma murino B16F10-Nex2 tratadas com diferentes concentrações do Extrato Diclorometano:metanol (1:1) de *Tillandsia recurvata*. 0: Controle do solvente, DMSO a 0,1%. Os resultados de três experimentos independentes em triplicata são expressos como média $\pm$ SEM. * vs. Controle 24 h; # vs. Controle 48 h (## $P < 0,05$) (***### $P < 0,001$).

Figura 9. Viabilidade das células de melanoma murino B16F10-Nex2 tratadas com diferentes concentrações do Extrato Etanólico (7:3) de *Tillandsia recurvata*. 0: Controle do solvente, DMSO a 0,1%. Os resultados de três experimentos independentes em triplicata foram expressos como média $\pm$ SEM. # vs. Controle 24 e 48 h (# $P < 0,05$, ### $P < 0,001$).

Figura 10. Morfologia das células de melanoma murino B16F10-Nex2 após 24 e 48 h de tratamento com os extratos de *T. recurvata* em diferentes concentrações no aumento de 100x.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de câncer de pele e seus respectivos subtipos.

Tabela 2. Regra do ABCDE para diferenciar uma alteração da pele em um processo maligno (câncer de pele) e benigno.

Tabela 3. Atividades biológicas de *Tillandsia recurvata* e parâmetros relacionados: parte utilizada, solvente(s) de extração, composto(s) isolado(s), modelo biológico, autor(es) e ano.

Tabela 4. Rendimento dos extratos de *T. recurvata*.

LISTA DE ABREVIATURAS

1:1TR - Extrato diclorometano:metanol (1:1) de *Tillandsia recurvata*

95:5TR – Extrato diclorometano:metanol (95:5) de *Tillandsia recurvata*

ASE – Extração acelerada por solvente

CO₂ – Dióxido de carbono

CBC – Carcinoma basal celular

CCE – Carcinoma de células escamosas

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EETR – Extrato etanol:H₂O (7:3) de *Tillandsia recurvata*

EHTR – Extrato hexânico de *Tillandsia recurvata*

FCBA – Faculdades de Ciências Biológicas e Ambientais

INCA - Instituto Nacional de Câncer

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóli

SISBIO - Sistema de autorização e informação em biodiversidade

T. recurvata – *Tillandsia recurvata*

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 CÂNCER	12
2.1.1 Etiologia e características.....	12
2.1.2 Processo Metastático.....	13
2.1.3 Câncer de Pele	14
2.2 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS.....	18
2.3 Gênero <i>Tillandsia</i>.....	20
2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Coleta do Material Vegetal	26
4.2. Preparo dos extratos de <i>Tillandsia recurvata</i>.....	27
4.2. Cultura Celular	27
4.2.1. Ensaio de viabilidade celular	28
4.2.2 Análise morfológica da linhagem de melanoma murino (B16F10-Nex2)	28
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
6. RESULTADOS.....	29
6.1 Rendimento dos extratos de <i>T. recurvata</i>.....	29
6.2 Efeito citotóxico dos extratos de <i>T. recurvata</i>.....	29
6.3 Análise morfológica das células de melanoma murino B16F10-Nex2	31
7. DISCUSSÃO.....	33
8. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	35

POTENCIAL CITOTÓXICO DE *Tillandsia recurvata* (L.) L. EM CÉLULAS DE MELANOMA

RESUMO

O câncer de pele do tipo melanoma é altamente agressivo e com elevado índice de mortalidade. Este tipo de câncer é caracterizado pela proliferação celular não controlada de melanócitos com alta capacidade metastática. Os tratamentos convencionais de quimioterapia e radioterapia apresentam efetividade limitada e efeitos adversos. Neste contexto, os produtos naturais têm sido fonte de moléculas ativas para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer. Destacamos, neste estudo, a espécie vegetal *Tillandsia recurvata*, uma planta epífita com capacidade de se adaptar a diferentes situações ambientais estressoras. Diversos estudos têm destacado o potencial anticâncer desta planta, em especial, pelos seus efeitos antiproliferativo, citotóxico e antiangiogênico. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade citotóxica de *T. recurvata* em células de melanoma. Para isso, utilizando a extração acelerada por solvente, quatro extratos de *T. recurvata* foram preparados utilizando-se subsequentemente os solventes orgânicos de diferentes polaridades: hexano, diclorometano:metanol (95:5 e 1:1, v/v), e etanol:H₂O (7:3 v/v), obtendo-se os extratos EHTR, E95:5TR, E1:1TR e EETR, respectivamente. Em seguida, células de melanoma murino B16F10-Nex2 foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos, 12,5-200 µg/mL, e submetidas ao ensaio de viabilidade celular utilizando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Os resultados foram utilizados para o cálculo da concentração inibitória de 50% (IC₅₀) das células B16F10-Nex2 pelos extratos. Os principais resultados mostram IC₅₀ de 14,49 ± 1,99 e 14,83 ± 2,33 µg/mL para E95:5TR após 24 e 48h, respectivamente; e de 176,41 ± 21,84 às 24 h apenas para E1:1TR. Na maior concentração avaliada, 200 µg/ml, o E95:5TR promoveu cerca de 76% de morte das células B16F10-Nex2. Em relação a morfologia, as células B16F10-Nex2, apresentaram pleomorfismo celular decorrente dos tratamentos com os diferentes extratos. Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo mostram, pela primeira vez, a ação citotóxica dos extratos diclorometano:metanol de *T. recurvata* em uma linhagem de melanoma altamente agressiva, com grande potencial metastático, abrindo perspectivas promissoras para estudos futuros.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de pele, Cravo-do-mato; bioprospecção; terpenos

CYTOTOXIC POTENTIAL OF TILLANDSIA RECURVATA (L.) L. IN MELANOMA CELLS

ABSTRACT

Melanoma skin cancer is highly aggressive and has a high mortality rate. This type of cancer is characterized by uncontrolled cell proliferation of melanocytes with high metastatic capacity. Conventional chemotherapy and radiotherapy treatments have limited effectiveness and adverse effects. In this context, natural products have been a source of active molecules for the development of new anticancer drugs. In this study, we highlight the plant species *Tillandsia recurvata*, an epiphytic plant capable of adapting to different stressful environmental situations. Several studies have highlighted the anticancer potential of this plant, especially for its antiproliferative, cytotoxic and antiangiogenic effects. In this context, the aim of this study was to investigate the cytotoxic activity of *T. recurvata* on melanoma cells. For this, using solvent-accelerated extraction, four extracts of *T. recurvata* were prepared using subsequently organic solvents of different polarities: hexane, dichloromethane:methanol (95:5 and 1:1, v/v), and ethanol :H₂O (7:3 v/v), obtaining the extracts EHTR, E95:5TR, E1:1TR and EETR, respectively. Then, B16F10-Nex2 murine melanoma cells were treated with different concentrations of extracts, 12.5-200 µg/mL, and submitted to cell viability assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2 ,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The results were used to calculate the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of B16F10-Nex2 cells by the extracts. The main results show IC₅₀ of 14.49 ± 1.99 and 14.83 ± 2.33 µg/mL for E95:5TR after 24 and 48h, respectively; and 176.41 ± 21.84 at 24 h only for E1:1TR. At the highest concentration evaluated, 200 µg/ml, E95:5TR promoted about 76% of the death of B16F10-Nex2 cells. Regarding morphology, B16F10-Nex2 cells showed cellular pleomorphism resulting from treatments with the different extracts. Taken together, the results obtained in this study show, for the first time, the cytotoxic action of dichloromethane:methanol extracts from *T. recurvata* in a highly aggressive melanoma cell line, with great metastatic potential, opening promising perspectives for future studies.

KEYWORDS: Skin cancer, Clove of the bush; bioprospecting; terpenes

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pela desregulação da proliferação celular, a partir da qual as células não diferenciadas, células malignas ou cancerosas, podem migrar para diferentes tecidos e órgãos, em um processo denominado metástase (Chambers; Groom; Macdonald, 2002; Quail; Joyce, 2013; Meirson; Gil-Henn; Samson, 2020). Liderando as estimativas como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, o câncer continua sendo um dos principais desafios para os pesquisadores e para a sociedade.

Estima-se que, anualmente, 14 milhões de novos pacientes são diagnosticados com câncer e 8 milhões de pessoas morrem em decorrência da doença (Chen et al., 2018). Desta maneira, o câncer se torna uma das principais causas de morte em todo o mundo (World Health Organization, 2020), além de causar danos exponenciais, principalmente em países em desenvolvimento (Shastri; Shastri, 2014).

Nos últimos anos a incidência e a mortalidade por câncer de pele vêm aumentando em todo o mundo. Os dois tipos básicos de câncer de pele são o melanoma e o carcinoma basocelular. Embora menos frequente, o tipo melanoma é o mais agressivo e com maior índice de mortalidade, consolidando-se como um grande problema ao sistema de saúde (Ahmed et al., 2020).

As formas convencionais mais indicadas para o tratamento ou controle do câncer de pele são por meio da ressecção cirúrgica seguida da quimioterapia ou radioterapia. Estas terapias não cirúrgicas podem desencadear danos colaterais elevados, além de não apresentarem resultados completamente satisfatórios (Chen et al., 2018).

Tratamentos mais eficazes, com menores efeitos adversos e com melhor custo-benefício são continuamente investigados (Mohanty et al., 2019), e as substâncias químicas advindas de produtos naturais atraem a atenção de pesquisadores por apresentarem atividades promissoras, principalmente no combate ao câncer.

Tillandsia recurvata é uma planta epífita da família *Bromeliaceae*, amplamente distribuída em diferentes tipos de ambientes, que tem demonstrado atividades anticâncer frente a diferentes linhagens anticancerígenas, mediadas por seus compostos bioativos (Lowe et al., 2017). Neste contexto, o objetivo

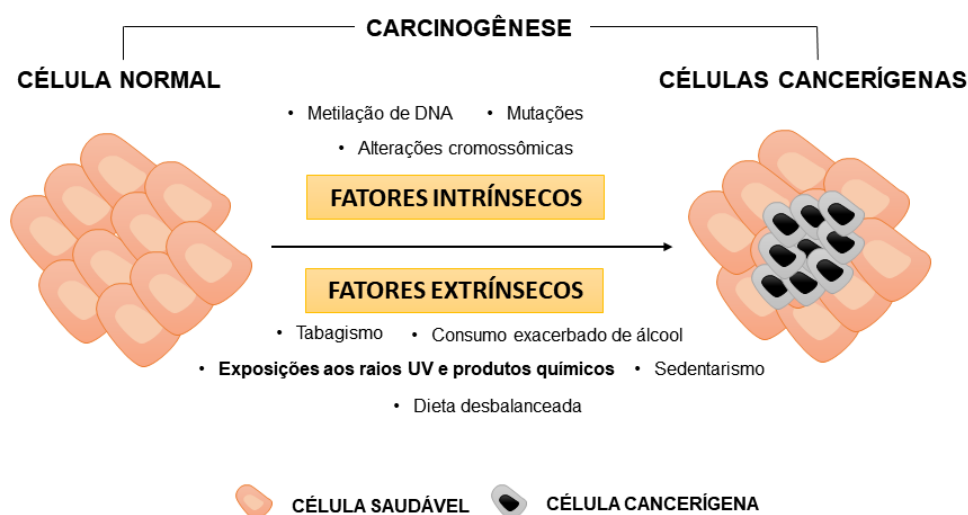
deste trabalho foi investigar a ação citotóxica de quatro diferentes extratos de *T. recurvata*, obtidos por extração acelerada por solvente (ASE), frente a linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

2.1.1 Etiologia e características

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022), o câncer é uma doença multifatorial que não possui uma causa específica e o seu surgimento se dá pela combinação de fatores intrínsecos e/ou extrínsecos, como por exemplo mutações e metilações no DNA (Graham; Sottoriva, 2017) e exposição a raios ultravioleta (UV) (WHO, 2022), respectivamente (Figura 1).



Fonte: Autoria própria, 2022

Figura 1. Fatores que podem promover a transformação de células normais em células cancerígenas.

Geneticamente, o câncer pode se desenvolver a partir de mutações em genes responsáveis por regular as atividades celulares essenciais, tais como crescimento celular, mecanismo de morte e até mesmo de reparo do DNA (Vogt et al., 2017; Copur et al., 2019). Sendo caracterizado pela proliferação celular desordenada, as células cancerosas primárias

podem migrar pelos sistemas corporais atingindo outros tecidos e órgãos, em um processo conhecido como metástase (Chambers; Groom; Macdonald, 2002; Quail; Joyce, 2013; Meirson; Gil-Henn; Samson, 2020).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022), estima-se que, cerca de 10 milhões de pessoas morreram em decorrência do câncer em 2020, sendo 1/3 dessas mortes relacionadas ao uso de tabaco, a obesidade e suas comorbidades, consumo exacerbado de álcool e uma dieta desbalanceada associada ao sedentarismo (WHO, 2022).

Além disto, aproximadamente 90% das mortes notificadas relacionadas ao câncer são oriundas dos processos metastáticos (Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017). Desta maneira, a principal causa de mortalidade relacionada aos processos oncológicos é a formação das metástases (Patel et Al., 2021).

2.1.2 Processo Metastático

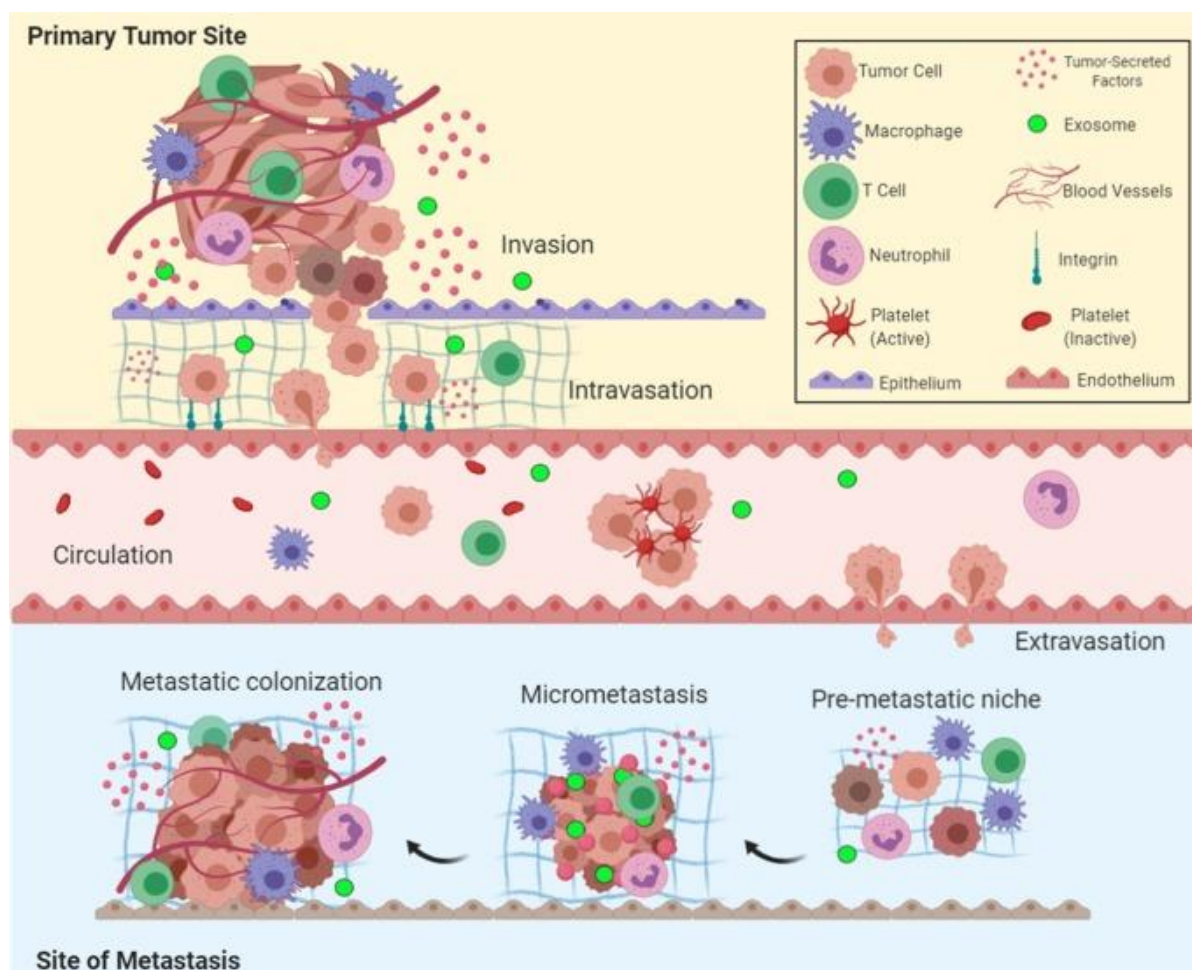
Metástase é o processo em que células cancerosas invadem outras partes saudáveis do corpo, marcando uma evolução final do câncer (Birkbak; Mcgranahan, 2020). É caracterizada como uma fase sistêmica devido a sua capacidade de migração para locais distintos da origem do tumor primário (Majidpoor; Mortezaee, 2021).

O processo metastático é considerado a principal causa de morte na maioria dos pacientes acometidos com câncer (Bergers; Fendt, 2021). De acordo com Fares et al., 2020, os passos envolvidos no processo metastático envolvem a invasão, intravasamento, circulação, extravasamento e colonização, como ilustrado na Figura 2.

A complexidade da cascata metastática dificulta a eficiência de terapias antitumorais (Majidpoor; Mortezaee, 2021). Notavelmente, há uma deficiência de alternativas terapêuticas que sejam eficazes contra o processo metastático (Esposito; Ganesan; Kang, 2021).

Destacam-se como características positivas para a metástase, células com alta capacidade de motilidade, evasão imunológica e de sobrevivência na circulação sanguínea (Birkbak; Mcgranahan, 2020). Assim,

a compreensão destes mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de terapias antimetastase.



Fonte: Fares et al., 2020

Figura 2. Etapas do processo metastático.

2.1.3 Câncer de Pele

Estima-se que cerca de 1,5 milhões de pessoas são acometidas com câncer de pele a cada ano, sendo a radiação UV um dos principais fatores de risco associado a doença (OMS, 2022). O câncer de pele pode ser dividido em dois tipos básicos: não melanoma e melanoma, seguido de seus respectivos subtipos, como apresentados na Tabela 1.

O câncer de pele não-melanoma é oriundo de células epiteliais queratinizadas, incluindo Carcinoma Basal Celular (CBC) e Carcinoma de Células Escamosas (CCE) (Linares; Zakaria; Nizran, 2015) que representam as

alterações de pele mais comum deste grupo de neoplasias (Brandt; Moore, 2019).

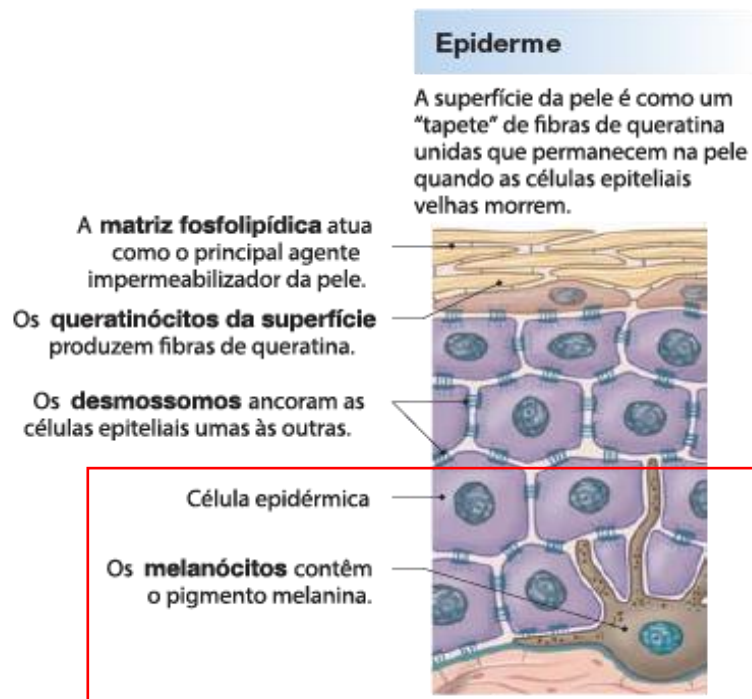
Tabela 1. Tipos de câncer de pele e seus respectivos subtipos.

CÂNCER DE PELE		
	SUBTIPOS	
	Carcinoma Basal Celular (CBC)	Carcinoma de Células Escamosas (CCE)
Não-melanoma	Basocelular nodular Basocelular superficial Basocelular morfológico	Doença de Bowen Eritroplásia de Queyrat
Melanoma	Melanoma Superficial Melanoma Nodular Melanoma Lentigo Maligna Melanoma Lentiginoso Acral	

Fonte: (Gordon, 2013).

O câncer de pele tipo melanoma é marcado pela proliferação desregulada dos melanócitos resistentes ao processo de morte (Ahmed et al., 2020). Localizados na camada basal da epiderme, os melanócitos são responsáveis pela produção de melanina, que são acondicionadas em melanossomas e transportada por dendritos que se estendem para os queratinócitos (Ahmed et al., 2020), como pode ser observado na Figura 3.

A incidência de pacientes acometidos com melanoma vem aumentando progressivamente, se estabelecendo como um grande problema de saúde pública (Ahmed; Qadir; Ghafoor, 2020). Segundo dados da *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) em 2020, foram registrados cerca de 325.000 novos casos de melanoma, com aproximadamente 80% dos óbitos (Saginala et al., 2021). Assim, o câncer melanoma é considerado o câncer de pele mais agressivo, embora menos comum (GEORGESCU et al., 2020).



Fonte: Adaptado de Silverthorn, 2017

Figura 3. Componentes celulares presentes na epiderme, em destaque, os melanócitos.

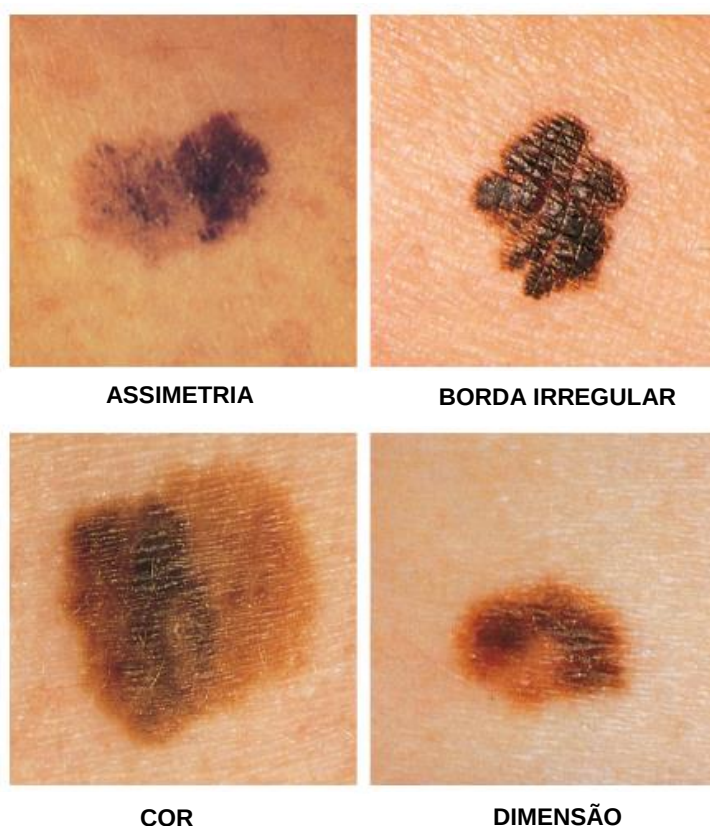
A melanina produzida pelos melanócitos é um antioxidante fundamental na proteção da pele contra os raios UV (Solano, 2020) que é o principal fator de risco para o surgimento do câncer de pele, que frequentemente acomete pessoas mais velhas e de pele clara (LaBerge et al., 2020). Além da radiação UV, os fatores genéticos contribuem grandemente para o desenvolvimento de neoplasias malignas na pele (Watson; Holman; Maguire-Eisen, 2016).

Um dos principais sinais do câncer de pele é a presença de lesões em áreas expostas ao sol, como a região da cabeça e do pescoço (Linares; Zakaria; Nizran, 2015). Além disso, é possível observar na Tabela 2 as diferenças entre as alterações de pele em um processo maligno e benigno, por meio da regra do ABCDE e na Figura 4 é possível visualizar as diferenças na pele.

Tabela 2. Regra do ABCDE para diferenciar uma alteração da pele em um processo maligno (câncer de pele) e benigno.

DESCRIÇÃO	ALTERAÇÕES DE PELE	
	MALIGNO	BENIGNO
Simetria	Assimétrico	Simétrico
Borda	Irregular	Regular
Cor	Dois tons ou mais	Tom único
Dimensão	Superior a 6 mm	Inferior a 6 mm
Evolução	Cresce e muda de cor	Não cresce e não muda de cor

Fonte: (Kittler, 2021)



Fonte: Why you should know about melanoma, 2017

Figura 4. Regra do ABCDE para diagnóstico de melanoma.

O diagnóstico do melanoma na maioria das vezes é feito a partir da biópsia da pele seguido por exame histopatológico (Linares; Zakaria; Nizran, 2015). O tratamento primário, tanto para o melanoma e não melanoma é cirúrgico. De acordo com dados da OMS até 2022 foram registrados cerca de 2.246 mil obtidos no Brasil, de ambos os sexos e de todas as idades, causados

pelo melanoma. Projeções lançadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) indica que o Brasil deverá registrar aproximadamente 185,6 mil novos casos de câncer de pele até o fim de 2022 (Schilithz et al., 2019; Neves, 2022).

2.2 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

Atualmente, os tratamentos recomendados para o controle do câncer incluem procedimentos cirúrgicos, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e terapias-alvo (Davis; Shalin; Tackett, 2019). O tratamento primário para remoção de melanoma localizado ocorre por meio de procedimentos cirúrgicos, que consiste na retirada da massa tumoral e do tecido saudável circundante (Davis; Shalin; Tackett, 2019). No entanto, esse procedimento não se aplica a tumores metastáticos, sendo necessário outra abordagem, como a radioterapia e a administração de drogas quimioterápicas que podem ser adjuvantes a ressecção cirúrgica (Agha et al., 2017).

A radioterapia não vem demonstrando melhora no quadro clínico de pacientes com melanoma metastático, devido o melanoma ser relativamente radio-resistente (Wagstaff et al., 2022).

As terapias medicamentosas se tornam a próxima linha de defesa quando os tratamentos cirúrgicos não são suficientes, seguidos de radioterapia. Terapias-alvo e imunoterápicos proporcionam ao paciente acometido com melanoma novas oportunidades de tratamento além de quimioterapia (Wagstaff et al., 2022)

Contudo, tanto para o melanoma quanto aos outros tipos de câncer, as atuais opções medicamentosas não são seletivas e podem ser agressivas, ocasionando citotoxicidade em células saudáveis do organismo (Pérez-Herrero; Fernández-Medarde, 2015), promovendo efeitos adversos, como queda de cabelo, perda de apetite, náuseas, vômitos e diarreia (American Cancer Society, 2018).

Um dos agentes quimioterápicos atuais para o câncer de pele é a Dacarbazina, a primeira droga quimioterápica reconhecida pela FDA para o tratamento de melanoma (Liu; Sheikh, 2014). Entretanto estudos indicam que o tratamento com Dacarbazina resulta em uma sobrevida mediana, não sendo

mais indicada como padrão paliativo para pacientes acometidos com melanoma metastático (Wagstaff et al., 2022). Esta droga é metabolizada exclusivamente pelo fígado, podendo ocasionar, dentre seus efeitos tóxicos ao organismo, insuficiência hepática aguda, que tem como mecanismo de ação ocasionar a inibição da síntese de DNA, impedindo a proliferação celular de células cancerígenas (Al-Badr; Alodhaib, 2016).

Outras estratégias terapêuticas como a terapia alvo e imunoterapia para o melanoma e melanoma metastático vêm sendo utilizadas, como por exemplo Vemurafenibe, Dabrafenibe, Trametinibe, Ipilimumabe, Pembrolizumabe, Nivolumabe (Liu; Sheikh, 2014; Mishra et al., 2018). Embora as opções de tratamento citadas apresentam menos efeitos adversos, a toxicidade para células saudáveis continua sendo um problema no tratamento do câncer. Neste cenário, é fundamental a busca por novos métodos terapêuticos que proporcionem ao paciente uma redução dos efeitos adversos além da melhoria do seu estado clínico (Leiter; Keim; Garbe, 2020).

Embora os avanços no tratamento do melanoma tenham sido significativos, proporcionando aos pacientes uma melhora no quadro de sobrevida (Curti; Faries, 2021), é fundamental a busca por novas estratégias terapêuticas para o câncer de pele. Em especial, para o melanoma, pois além de ser agressivo, apresenta alto potencial metastático (Sundararajan et al., 2022).

Interessantemente, os produtos naturais apresentam substâncias bioativas, como os metabólitos secundários, os quais têm apresentado potencial para o controle de células cancerígenas, tornando-se assim, um alvo promissor para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer (LIU et al., 2020), bem como medicamentos já disponíveis, dentre eles o paclitaxel, vincristina e vimblastina que são agentes quimioterápicos sugeridos para o tratamento de cancer de pele do tipo melanoma, que atuam interrompendo o ciclo celular de células cancerígenas e induzindo-as à morte (Schinzari et al., 2017; Zhu; Chen, 2019; Mattila et al., 2020).

2.3 Gênero *Tillandsia*

O gênero *Tillandsia* é o maior da família *Bromeliaceae* e engloba mais de 700 espécies que estão divididas em 7 subgêneros que apresentam distribuição na América Tropical e subtropical até o norte da América Central e dos Andes (Tardivo et al., 2020). Grande parte das espécies pertencentes ao gênero *Tillandsia* apresentam comportamento epífita com capacidade de se adaptar a diferentes situações estressoras colaborando para a produção de diferentes metabólitos secundários (Estrella-Parra et al., 2019).

No Brasil, a distribuição geográfica das *Tillandsia* abrange cerca de 18 estados (Figura 5). Em ambientes urbanos elas são comumente encontradas em árvores, alvenarias e fios de energia (WFO, 2022).



Fonte: WFO, 2022

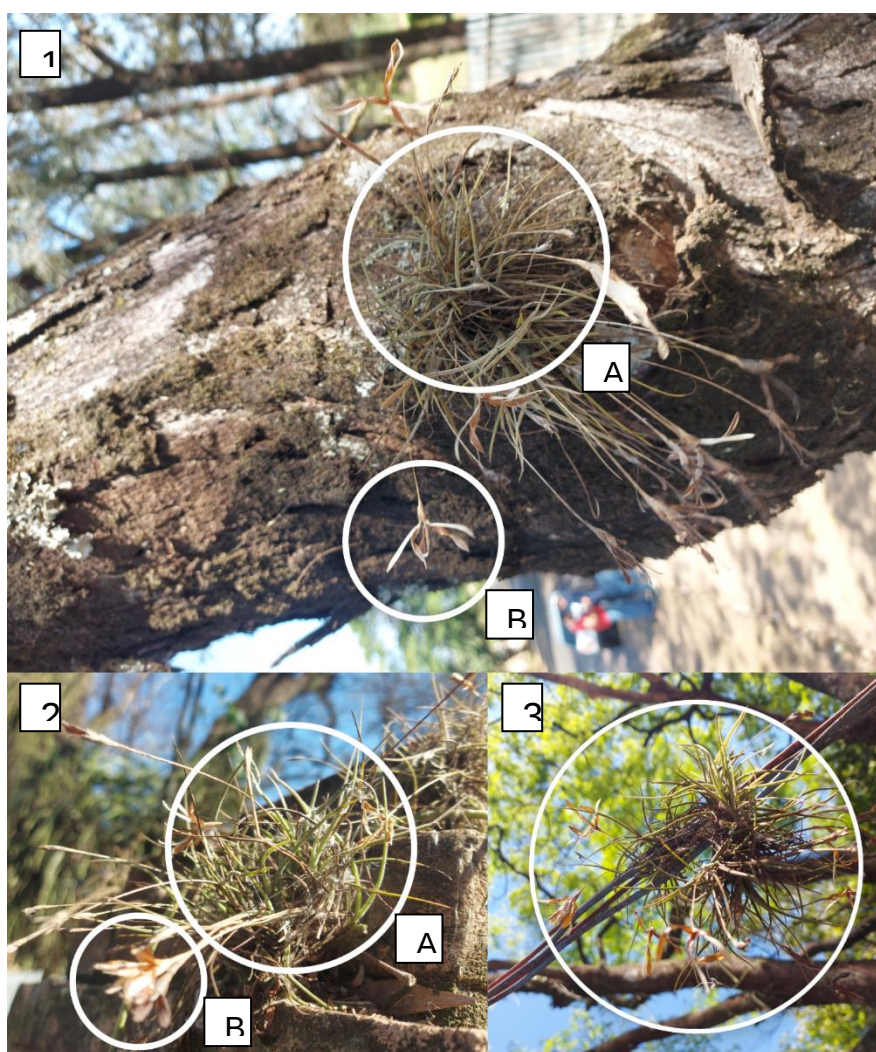
Figura 5. Distribuição geográfica de *Tillandsia* no território brasileiro.

Pertencente ao subgênero *Diaphoranthema*, destacamos neste estudo, a espécie vegetal *Tillandsia recurvata* (Figura 6), uma planta epífita, popularmente conhecida como cravo-do-mato, tradicionalmente utilizada em forma de infusão aquosa contra reumatismo, úlceras e hemorroidas (Agra et al., 2007), cujo desenvolvimento ocorre a partir da absorção de nutrientes disponíveis tanto no

ar quanto na água, majoritariamente advindos das chuvas (Gonzalez et al., 2022).

Interessantemente, os produtos naturais se destacam quanto a saúde por serem uma fonte importante de biomoléculas farmacologicamente ativas (Newman & Cragg, 2003; Deng et al., 2020). Estes produtos vêm ganhando espaço e apresentam papel fundamental na descoberta de novas estratégias terapêuticas, especialmente relacionadas ao câncer (Atanasov et al., 2018).

Neste contexto, destacam-se as plantas medicinais, em especial devido às suas propriedades terapêuticas relacionadas aos seus metabólitos secundários



. Fonte: Os autores, 2022

Figura 6. *Tillandsia recurvata*, planta aérea em 1 árvore, 1A: folha, 1B: flor; 2 alvenarias, 2A: folha, 2B: flor; 3: fio de eletricidade

A produção de metabólitos secundários nas plantas está relacionada com a capacidade das plantas em superar desafios ambientais, principalmente abióticos (Akula; Ravishankar, 2011), promovendo a produção de diferentes constituintes fitoquímicos como os compostos fenólicos, flavonoides, terpenos e alcaloides que apresentam efeitos benéficos a saúde, principalmente por desempenharem atividade anticâncer (Huang et al., 2021). Adicionalmente, diversos estudos relacionam a atividade terapêutica das plantas medicinais com a presença desses constituintes químicos (Li et al., 2020)

Curiosamente, a literatura apresenta que diferentes produtos naturais vem sendo utilizando para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos para diferentes tipos de câncer (N. Nwodo et al., 2015). E diversos agentes terapêuticos anticancerígenos amplamente utilizados são oriundos de fontes naturais, como por exemplo, a vincristina, que é um metabólito que compõe o grupo de fármacos denominados como alcaloides da vinca, que são capazes de bloquear o crescimento celular de células cancerígenas (Below et al., 2020).

Diversos estudos tem relato a presença de metabólitos secundários presente no gênero *Tillandsia*, principalmente pertencentes às classes dos triterpenóides e flavonoides (Manetti et al., 2009), compostos fenólicos (Lowe et al., 2014), além de esteróis e fenilpropanóides (Gonzalez et al., 2022) que são compostos amplamente conhecidos por desempenharem atividades bioativas.

Outras espécies do gênero *Tillandsia* vêm sendo investigadas por desempenharem atividades biológicas, como *Tillandsia usneoides*, estudada por apresentar atividade hipoglicêmica (Witherup et al., 1995) e *Tillandsia streptocarpa*, por demonstrar potencial antioxidante e antimicrobiano (Delaporte et al., 2004).

Adicionalmente, visando compreender melhor as propriedades biológicas de *T. recurvata*, foi realizado no mês de setembro de 2022, uma revisão bibliográfica na base de dados PubMed utilizando as seguintes palavra-chave: “*Tillandsia recurvata*” and “*Biological Activity*” e “*Tillandsia recurvata*” and “*Bioactive Compounds*”. Como pode ser observado na Tabela 3, existem alguns estudos, em especial realizados por Lowe et al., sobre o potencial citotóxico de

T. recurvata. Nestes, é possível verificar a capacidade de diferentes extratos desta espécie vegetal na redução da viabilidade celular de diferentes linhagens cancerígenas (Lowe et al., 2012; Lowe et al., 2013; Lowe et al., 2014).

Manetti et al., 2009, relatou alguns triterpenóides encontrados em abundância na subfamília Tillandsioideae, no qual a *T. recurvata* está inserida, dentre os compostos isolados destacam-se os cicloartanos, lanostanos, lábdanos, derivados do arborinol, a friedelina e esteroides.

Estudos indicam o potencial citotóxico de cicloartanos isolados de *T. recurvata* que apresentam resultados promissores frente a diversas linhagens cancerígenas (Lowe, 2014). Adicionalmente, demais estudos relatam a presença majoritária desse composto em espécies de *Tillandsia*, (Cabrera e Seldes, 1995; Cabrera e Seldes, 1996; Lowe, 2014).

Lowe et al., 2013 relatou o isolamento de dois dicinamatos presentes no extrato de clorofórmio bruto de *T. recurvata*, sendo 1,3-di-O-Cinamoil-glicerol (1) e (E)-3-(cinamoiloxi)-2-hidroxipropil 3-(3,4-dimetoxifenil) acrilato, que foram responsáveis pela atividade citotóxica em melanoma humano (A375), câncer de mama (MCF-7) e câncer de próstata. Uma patente registrada em 2010 por Lowe, indica que o extrato metanólico de *T. recurvata* apresenta atividade biológica frente o câncer de próstata (Lowe et al., 2013).

A avaliação citotóxica de plantas medicinais tem utilizado a cultura de células como ferramenta para se obter respostas de potencial antitumoral de extratos e compostos, frente a diferentes linhagens celulares (Mendes, 2011). Assim, considerando-se a revisão bibliográfica levantada referente aos estudos anticâncer de *T. recurvata*, este estudo utilizou a linhagem cancerígena B16F10-Nex2, conhecida por ser uma linhagem agressiva de melanoma com alto potencial metastático, devido a sua elevada taxa de proliferação (Mendes, 2011).

Tabela 3. Atividades biológicas de *Tillandsia recurvata* e parâmetros relacionados: parte utilizada, solvente(s) de extração, composto(s) isolado(s), modelo biológico, autor(es) e ano.

PARTE UTILIZADA	SOLVENTE(S) DE EXTRAÇÃO	COMPOSTO(S) ISOLADO(S)	ATIVIDADE(S) BIOLÓGICA(S)	MODELO BIOLÓGICO	AUTOR(ES) E ANO
Partes aéreas	-	-	Bioindicador de poluição	-	Graciano et al., 2003
Partes aéreas	Clorofórmio	Cicloartano-3,24,25-triol	Antiproliferativo e Inibição de Quinases	Câncer de próstata (PC-3 e DU145) e MRCK α	Lowe et al., 2012
Partes aéreas	Clorofórmio	-	Inibição de Quinases	CSNK2A2, MEK5, GAK, FLT e DRAK1	Lowe et al., 2012
Partes aéreas	Clorofórmio	1,3-di-O-Cinamoil glicerol Brometo de (E)-(2-(3-(3,4-dimetoxifenil)acrilóxi)-2-hidroxipropoxi)-2-oxoetil)trifenilfosfônio	Antiangiogênica	Anéis aórticos de ratos <i>Sprague-Dawley</i>	Lowe et al., 2012
Partes aéreas	Clorofórmio	1,3-di-O-Cinamoil-glicerol (E)-3-(cinamoilóxi)-2-hidroxipropil 3-(3,4-dimetoxifenil)acrilato	Citotóxico	Melanoma humano (A375), Câncer de Mama (MCF-7) e Câncer de Próstata Humano (PC-3)	Lowe et al., 2013
Partes aéreas	Metanol	-	Antiproliferativo	Melanoma (B-16) e Linfoma de Células B de uma estirpe transgênica de camundongos)	Lowe et al., 2013
Partes aéreas	Metanol	Cicloart-23-eno-3,25-diol Cicloartano-3,24,25-triol Cicloart-25-eno-3,24-diol ácido 3,23-dioxo-9,19-ciclanost-24-en-26-óico Dihidroxicicloartan-3-ona Hidroxicicloart-23-en-3-ona, 25	Antileucemia	Células Leucêmicas (HL-60, K562, MOLM14, MonoMac6)	Lowe et al., 2014
Partes aéreas	Metanol	-	Antidiabético	Ratos	Lowe et al., 2014
Partes aéreas	Etanólico	-	Cicatrizante	Ratos <i>Sprague-Dawley</i> Células de Neuroblastos (IMR-32), Câncer de mama (MDA-MB-231), Melanoma humano (A375), leucemia (MV4-11), câncer de próstata (PC-3)	Bahado, 2014
Partes aéreas	Tecnologia de extração de fluidos supercríticos com CO ₂	5,3'-dihidroxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavanona	Anticâncer e antiproliferativo	Células de Neuroblastos (IMR-32), Câncer de mama (MDA-MB-231), Melanoma humano (A375), leucemia (MV4-11), câncer de próstata (PC-3)	Lowe et al., 2017
Partes aéreas	Diclorometano e Metanol	-	Antivirulência	<i>Chromobacterium violaceum</i> e <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Pérez-Lopez et al., 2020

2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os compostos bioativos podem ser extraídos por diferentes técnicas, algumas usadas a milênio, como infusão, decocção e maceração. Diversos fatores influenciam uma extração bem-sucedida de metabólitos secundários, como por exemplo, a escolha da técnica, polaridade dos solventes utilizados na extração, bem como o tempo e temperatura durante o processo (Soquetta, 2019).

Os métodos de extração podem ser classificados em métodos convencionais e não-convencionais. Em geral, os métodos convencionais de extração são realizados em temperatura ambiente, sem controle de pressão, por um longo período de extração (Barros et al., 2013). Contudo, técnicas com maior controle dessas variáveis, aumentam a eficiência da extração quanto a compostos de interesse.

Neste sentido, técnicas mais avançadas são sugeridas para extração seletiva de metabólitos secundários (HAQUE et al., 2017) que incluem, a extração por fluidos supercríticos, extração assistida por micro-ondas e extração acelerada por solvente (JONES; KINGHORN, 2012), nas quais permitem que classes de compostos sejam extraídas de acordo com a polaridade do solvente utilizado.

Destacamos neste estudo, a tecnologia de Extração Acelerada por Solvente (ASE) devido sua capacidade em utilizar temperaturas e pressões elevadas durante o processo de extração, mas por curtos períodos de tempo, principalmente para extração de compostos com propriedades bioativas (Fan et al., 2021), além do benefício de alto rendimento, o que torna a técnica atrativa (Sun et al., 2012).

Garantindo uma extração mais precisa, a técnica diferencia-se, como citado, pela manutenção de pressões elevadas (>100 psi) que permite que os solventes utilizados para extração, sejam aquecidos a temperaturas que ultrapassem o seu ponto de ebulição (Pinto; Lanças, 2009).

Neste estudo, foi utilizada a tecnologia do ASE para a produção de quatro diferentes extratos das partes aéreas de *T. recurvata* visando um maior arraste de compostos bioativos separados de acordo com a polaridade crescente dos

solventes utilizados, sendo eles: Hexano, Diclorometano e metanol 95:5 e 1:1, e Etanol 70%.

Os solventes utilizados, em grau crescente de polaridade, são hexano (apolar), diclorometano:metanol e etanol. De acordo com a sua polaridade, os solventes têm capacidade de extrair determinadas classes de metabólitos secundários em maior concentração.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o potencial citotóxico de *Tillandsia recurvata* em célula de melanoma.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar quatro extratos de *T. recurvata*, utilizando solventes de diferentes polaridades, sendo hexânico, diclorometano:metanol (95:5), diclorometano:metanol (1:1) e hidroetanólico (7:3) pelo método de Extração Acelerada por Solvente (EAS);
- Investigar o potencial citotóxico de diferentes concentrações dos extratos de *T. recurvata*, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, em linhagem de melanoma murino (B16F10-Nex2) nos períodos de 24 e 48h de tratamento, e determinar a concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC₅₀) através do ensaio colorimétrico utilizando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT);
- Analisar a morfologia das células de B16F10-Nex2 tratadas com os diferentes extratos nos períodos de 24 e 48h.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do Material Vegetal

Espécimes de *Tillandsia recurvata* foram coletadas no município de Dourados, localizado no estado de Mato Grosso do Sul, região Centro-oeste do Brasil, sob as coordenadas geográficas (22°13'10.3"S 54°48'59.6"W), em novembro de 2020, após a autorização obtida pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO 86171). A identificação do material

vegetal foi realizada pelo botânico Prof^o. Dr^o. Sandro Menezes Silva da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA, UFGD), Dourados-MS, Brasil. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) com o registro de 6435/DDMS.

4.2. Preparo dos extratos de *Tillandsia recurvata*

Para obtenção dos extratos, o material vegetal foi higienizado com SUMAVEG e posteriormente desidratado em estufa com circulação de ar à 40 °C durante 18 dias até obter peso constante. Em seguida, o material foi pulverizado em moinho de facas. O material pulverizado foi utilizado para obtenção dos extratos utilizando Extrator Acelerado por Solvente (ASE 150 DionexTM®): os seguintes solventes foram aplicados de maneira subsequente sob o mesmo material em pó: Hexano 100%, Diclorometano:metanol (95:5), Diclorometano:metanol (1:1) e Etanol:H₂O (7:3), obtendo-se respectivamente os extratos EHTR, E95:5TR, E1:1TR e EETR. Para extração foram utilizados os seguintes parâmetros: ciclo estático de extração de 4 minutos, volume de lavagem de 80% e purga de 40 segundos (gás nitrogênio). Foram utilizados três ciclos para cada solvente. A temperatura utilizada na extração para os solventes foi de 70°C para o extrato Hexânico e 100°C para os extratos Diclorometano:metanol (95:5 e 1:1) e Etanol:H₂O (7:3). Os solventes foram removidos por rotaevaporação, e apenas o EETR foi liofilizado. Os demais extratos foram secos em capela de exaustão e dessecador. O solvente utilizado para dissolver os extratos de *T. recurvata* foi o dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração final de 0,1%. Contudo, o extrato hexânico, EHTR, não foi solúvel em DMSO, a despeito de sonicação, aquecimento e longos períodos de agitação do extrato. Assim, a investigação citotóxica do EHTR não foi avaliada neste estudo. O cálculo do foi obtido através da fórmula a seguir.

$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato seco} / \text{massa do material vegetal seco}) * 100$

4.2. Cultura Celular

As células da linhagem cancerígena de melanoma murino, B16F10-Nex2, utilizadas neste estudo, foi isolada na Unidade Experimental de Oncologia (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP) a partir da linhagem celular

B16F10 e foram cultivadas em meio RPMI 1640 e mantidas em garrafas de cultivo celular contendo seu meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (5 mg de penicilina, 5 mg de estreptomicina). A linhagem celular foi acondicionada em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂.

4.2.1. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi realizada de acordo com Castro et al., 2019, através do ensaio colorimétrico utilizando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Em resumo, as células de B16F10-Nex2 foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^3 e, em seguida, tratadas com as concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL de EHTR, E95:5TR e E1:1TR e EETR, durante 24 e 48 h. Após o período de tratamento, o meio foi removido e os poços foram lavados com PBS 1x (tampão fosfato-salino). Em seguida, foi adicionado 100 µL de MTT (0,5 mg/mL) em todos os poços, seguido de incubação por 4h à 37°C em estufa de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi removido e em seguida foi adicionado 100 µL do solvente DMSO para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi determinada a 630 nm em Leitor *TP-READER*, *Thermo Plate*. A inibição da viabilidade celular foi calculada através da fórmula a seguir.

$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{Abs}_{\text{células tratadas}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) \times 100$
--

4.2.2 Análise morfológica da linhagem de melanoma murino (B16F10-Nex2)

Ao final dos tratamentos de 24 e 48h, como descrito anteriormente no item 4.2.1, foram adquiridas imagens das células B16F10-Nex2 em Microscópio Invertido de Fases na objetiva de 100x.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. Para avaliar a diferença entre os grupos estudados, foi aplicado análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Dunnnett* sendo considerado significativo quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 8 (Intuitive Software For Science, San Diego, CA, EUA)*.

6. RESULTADOS

6.1 Rendimento dos extratos de *T. recurvata*

Os resultados em relação aos rendimentos dos extratos de *T. recurvata* está apresentado na tabela abaixo.

Tabela 4. Rendimento dos extratos de *T. recurvata*.

EXTRATOS	RENDIMENTO (%)
Hexânico 100% (EHTR)	4,08
Diclorometano:metanol (95:5) (E95:5TR)	2,01
Diclorometano:metanol (1:1) (E1:1TR)	5,34
Etanol:H ₂ O (7:3) (EETR)	8,28

6.2 Efeito citotóxico dos extratos de *T. recurvata*

Os efeitos dos extratos de *T. recurvata* sobre a viabilidade celular das células de melanoma murino B16F10-Nex2 são apresentados nas figuras 7 a 9.

A Figura 7, mostra a capacidade do extrato E95:5TR em reduzir a viabilidade celular das células de B16F10-Nex2, desde a menor concentração em 50 e 58% até 77 e 75% na concentração de 200 µg/mL em 24 e 48 h, respectivamente. Com IC₅₀ de 14,49 ± 1,99 µg/mL, em 24h, e de 14,83 ± 2,33 µg/mL em 48h de tratamento.

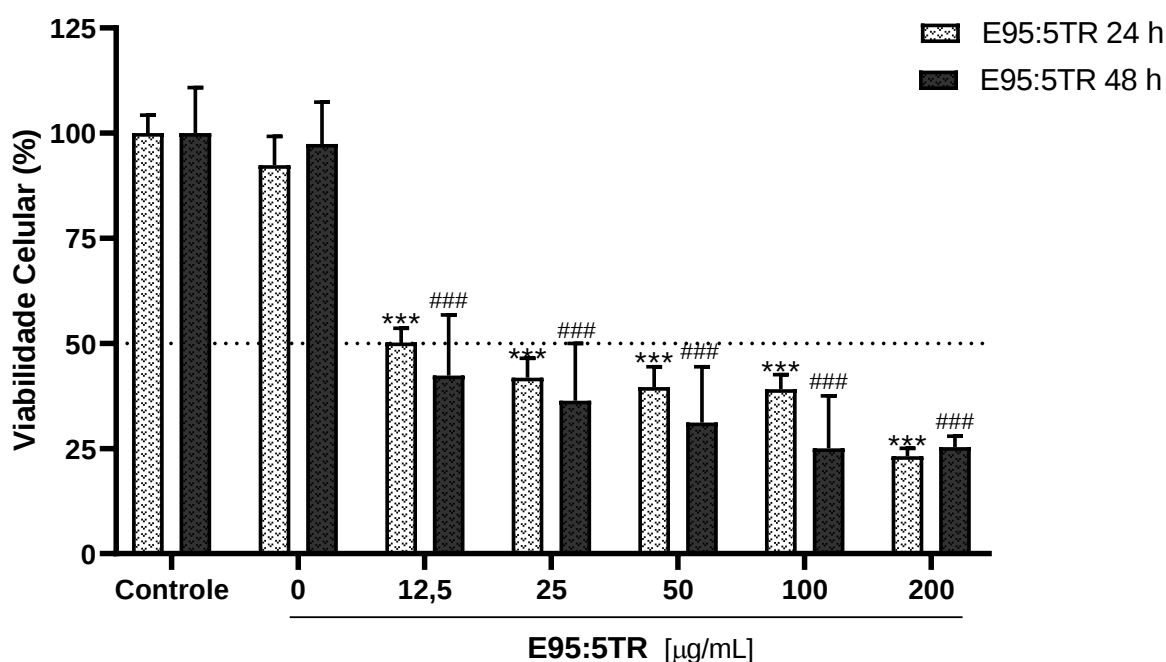


Figura 7. Viabilidade de células de melanoma murino B16F10-Nex2 tratadas com diferentes concentrações do Extrato Diclorometano:metanol (95:5) de *Tillandsia recurvata* durante 24 e 48h. 0: Controle do solvente, DMSO a 0,1%. Os resultados de três experimentos independentes em triplicata foram expressos como média $\pm$ SEM. *** vs. Controle 24 h; ### vs. Controle 48 h com $P < 0,001$.

Os resultados do E1:1TR sobre a viabilidade de células B16F10-Nex2 podem ser observados na Figura 8. O E1:1TR em 24 h e 48 h de tratamento, reduziu a população tumoral a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, na maior concentração avaliada houve redução de aproximadamente 50% de viabilidade celular, para ambos períodos avaliados. No período de 48h observou-se uma redução da viabilidade celular isolada na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, de aproximadamente 17% da viabilidade celular. O IC_{50} do E1:1TR, foi de $176,41 \pm 21,84$ $\mu\text{g/mL}$ para o período de 24 h de tratamento, no entanto, não foi possível determinar o valor do IC_{50} para 48 h.

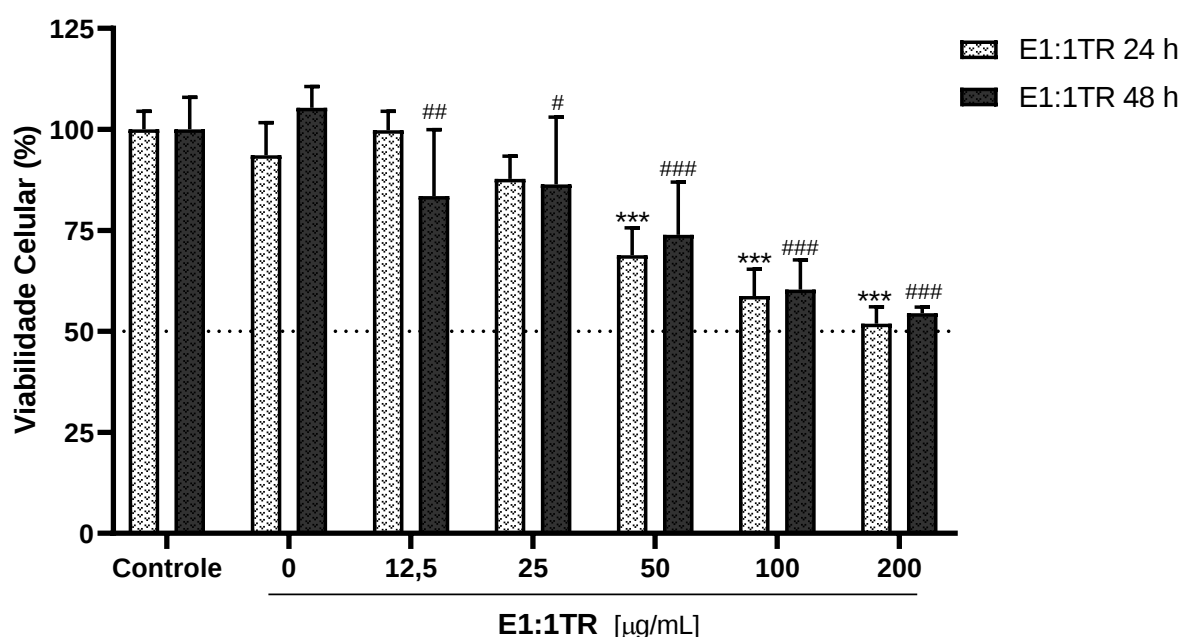


Figura 8. Viabilidade de células de melanoma murino B16F10-Nex2 tratadas com diferentes concentrações do Extrato Diclorometano:metanol (1:1) de *Tillandsia recurvata*. 0: Controle do solvente, DMSO a 0,1%. Os resultados de três experimentos independentes em triplicata são expressos como média $\pm$ SEM. * vs. Controle 24 h; # vs. Controle 48 h (## $P < 0,05$) (***### $P < 0,001$).

Os dados apresentados na Figura 9 indicam a ausência de toxicidade do EETR em células de melanoma nas diferentes concentrações avaliadas, 12,5 a 200 $\mu\text{g/mL}$, nos períodos de 24 h. Quando tratadas por 48 h com o EETR, é possível observar uma diminuição da população cancerígena de aproximadamente 25%, exceto na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Não foi possível calcular o IC_{50} para o EETR.

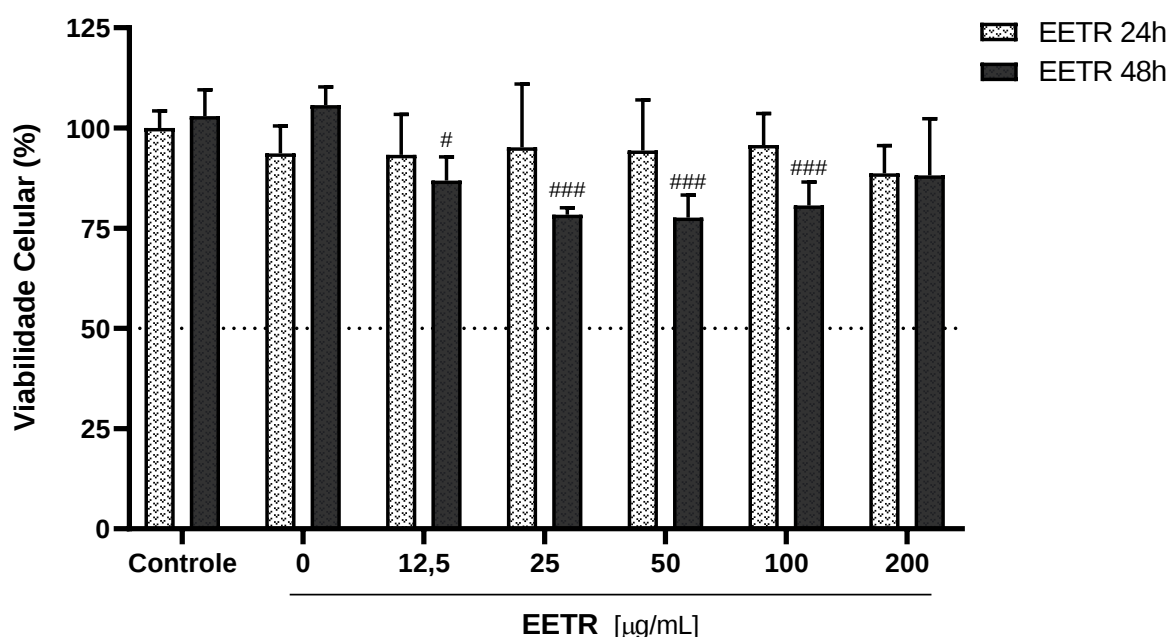


Figura 9. Viabilidade das células de melanoma murino B16F10-Nex2 tratadas com diferentes concentrações do Extrato Etanólico (7:3) de *Tillandsia recurvata*. 0: Controle do solvente, DMSO a 0,1%. Os resultados de três experimentos independentes em triplicata foram expressos como média $\pm$ SEM. # vs. Controle 24 e 48 h (# $P < 0,05$, ### $P < 0,001$).

6.3 Análise morfológica das células de melanoma murino B16F10-Nex2

As imagens da morfologia de célula B16F10-Nex2 tratadas com os extratos de *T. recurvata* são apresentados na figura 10. O tratamento das células com os extratos diclorometano:metanol (95:5 e 1:1) com seus respectivos IC_{50} reduziram a população celular e proporcionaram pleomorfismo celular, ou seja, as células originalmente fusiformes tornaram-se arredondadas. Contudo, o EETR não alterou a morfologia das células quando comparadas ao controle.

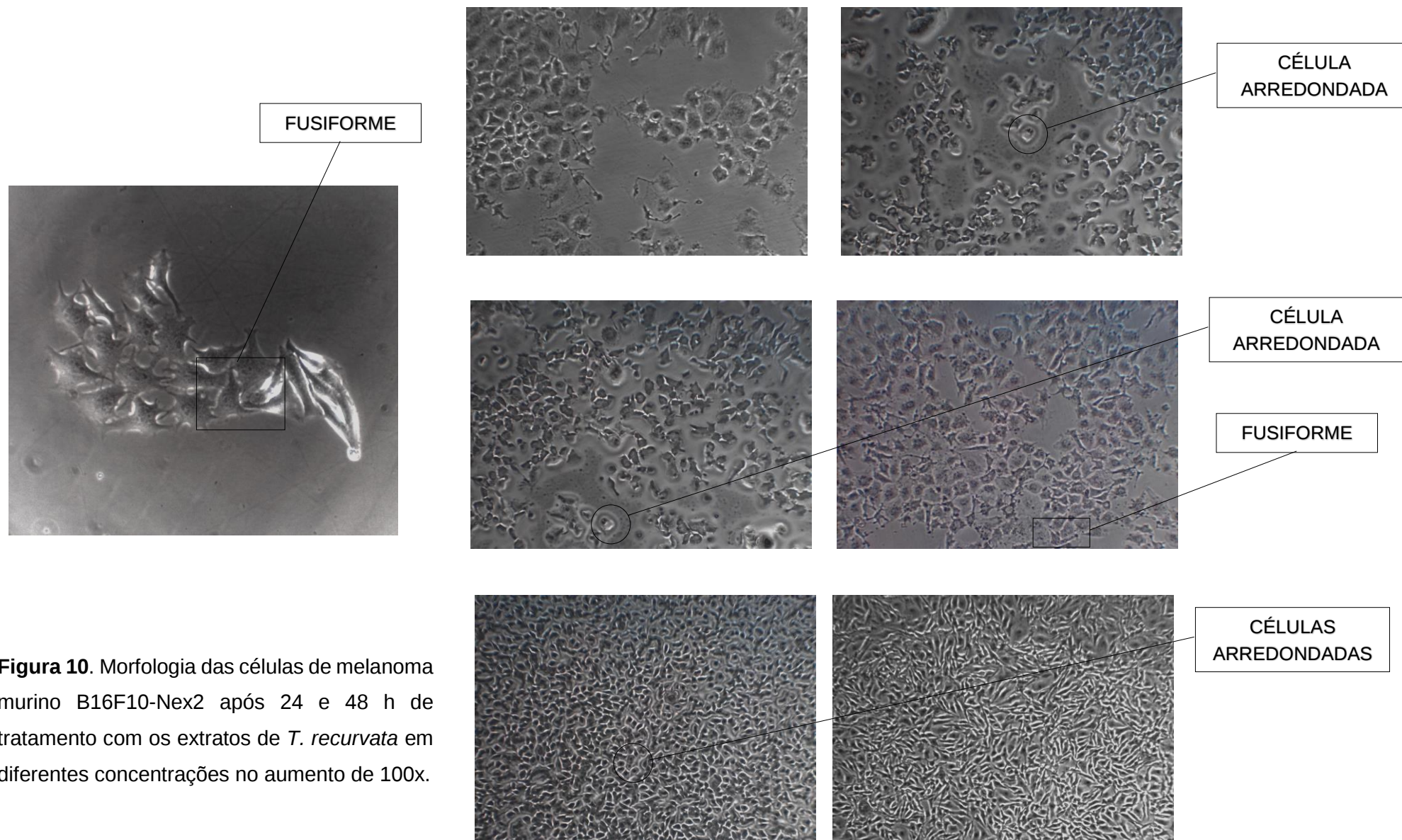


Figura 10. Morfologia das células de melanoma murino B16F10-Nex2 após 24 e 48 h de tratamento com os extratos de *T. recurvata* em diferentes concentrações no aumento de 100x.

7. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo revelaram a atividade citotóxica dos extratos diclorometano:metanol (95:5 e 1:1) de *T. recurvata* em células de melanoma murino B16F10-Nex2, uma linhagem de câncer agressiva com alta capacidade metastática.

O extrato E95:5TR demonstrou atividade citotóxica promissora em células de melanoma e essa atividade pode ser relacionada ao processo de extração utilizado, visto que a Extração Acelerada por Solvente apresenta um maior arraste de compostos bioativos devido a sua eficiência de extração (Barros et al., 2013), resultando em uma resposta acentuada de toxicidade frente a linhagem utilizada, mediada pelos compostos bioativos presentes no extrato.

O extrato E1:1TR também demonstrou atividade citotóxica, sendo mais acentuada na maior concentração avaliada. Embora não tenha se detectado o valor de IC₅₀ para 48 h, é possível observar que não houve grande diferença entre os períodos de tratamentos, visto que para ambos os períodos avaliados, houve a inibição de aproximadamente 50% da viabilidade celular.

A atividade citotóxica do E95:5TR e E1:1TR pode estar relacionada a capacidade desses solventes em extrair compostos da classe dos terpenos, visto que alguns estudos utilizando a extração com metanol das partes aéreas de *T. recurvata* relatam a presença de compostos majoritariamente da classe dos terpenos, responsáveis pelo potencial citotóxico em diferentes linhagens cancerígenas (Lowe et al., 2012-2013-2014). Os triterpenos de cicloartanos, também identificados em outros gêneros botânicos, inclusive utilizando extração com diclorometano, também tem sido descritos como citotóxicos, antioxidante e antiinflamatório (Li et al., 2018; Santos Silva et al., 2022; Youn et al., 2016; Xia; Dai; Sun, 2018).

Além disso, já foram identificados outros metabólitos secundários como fenilpropanoglicosídeos (Vasconcelos et al., 2013) e flavonoides (Lowe et al., 2017) que foram citotóxicos frente a diversas linhagens cancerígenas. Contudo, como ainda não há relatos científicos do perfil químico de extratos de *T. recurvata* produzido por diclorometano:metanol (95:5 por ASE), este estudo relata pela primeira vez a maior potência desse extrato, frente aos demais,

expressando efeitos de substâncias individuais ou ainda, sinergismo entre compostos, que futuramente serão investigados.

Adicionalmente, foi possível observar a indução do pleomorfismo celular da B16F10-Nex2 frente ao tratamento com os extratos de *T. recurvata*, em ambos os períodos avaliados. O pleomorfismo celular é característico dessa linhagem, que se refere a habilidade de variar a sua morfologia de acordo com o estágio do ciclo celular e de condições ambientais. Os resultados indicam a permanência das células sobreviventes fixadas na matriz extracelular presente nos poços de tratamento. Além do pleomorfismo celular, foi possível identificar uma redução promissora da viabilidade celular desencadeada principalmente pelo E95:5TR. Portanto, esses resultados corroboram os dados obtidos no ensaio de MTT, confirmando o potencial citotóxico dos extratos de *T. recurvata* em células de melanoma murino.

A linhagem de melanoma utilizada nesse estudo valoriza a atividade citotóxica observadas pelos extratos, pois a linhagem B16F10-Nex2, como já citado anteriormente, apresenta alto potencial metastático. Além disso, Mendes., 2011 relata que essa linhagem apresenta resistência aos tratamentos devido a sua capacidade de proliferação agressiva. Futuramente, serão investigados as classes de compostos presentes em cada extrato de *T. recurvata*, afim de explorar os mecanismos de morte promovidos pela espécie vegetal avaliada neste estudo.

Um dos principais desafios nos tratamentos atuais são a resistência de células cancerígenas que conseguem sobreviver mesmo após os procedimentos quimioterápicos, naturalmente essas células ativam mecanismos de escape, driblando o sistema imunológico antes mesmo de uma resposta anticâncer endógena (Davis; Shalin; Tackett, 2019). Mesmo com a possibilidade de combinação entre os métodos convencionais para o tratamento ou controle do câncer, as terapias disponíveis não apresentam resultado máximo esperado durante o tratamento, reforçando a necessidade de terapias alternativas para o câncer.

Atualmente, há a disposição uma grande quantidade de métodos anticâncer e a indicação do tratamento depende do tipo de câncer, a sua

evolução cancerosa e do local de origem, entretanto, não há relatado tratamentos que sejam específicos (Wang; Lei; Han, 2018), visando assim a necessidade pela busca de métodos alternativos que promovam seletividade tumoral (Vendramin; Litchfield; Swanton, 2021). Coincidentemente, os produtos naturais como a *T. recurvata* apresentam propriedades bioativas que possam ser eficientes para o controle de células imortalizadas (Lowe et al., 2017).

Neste estudo, evidenciamos que os extratos desempenharam relevante ação citotóxica com potencial para exercerem protagonismo nessa atividade biológica, podendo ser sugeridos como uma alternativa para as terapias convencionais, como a quimioterapia e a radioterapia, visto que já estão descritas na literatura diversas atividades biológicas promissoras do gênero das *Tillandsias*, principalmente da *T. recurvata* (Witherup et al., 1995, Lowe, 2012, Lowe, 2013, Lowe, 2014).

8. CONCLUSÃO

Este estudo relatou pela primeira vez o perfil de citotoxicidade de diferentes extratos de *Tillandsia recurvata* sobre a linhagem tumoral B16F10-Nex2, demonstrando a atividade citotóxica do E95:5TR ao reduzir fortemente a viabilidade e modificar a morfologia celular. Considerando que ambos extratos diclorometano:metanol, E95:5TR e E1:1TR, apresentaram atividade citotóxica, abrem-se novas oportunidades para pesquisas relacionadas a identificação dos compostos presentes em *T. recurvata* e o perfil de morte celular induzido, bem como a avaliação de *T. recurvata* em associação aos tratamentos já existentes.

REFERÊNCIAS

- AGHA, AYA, AND AHMAD A. TARHINI. "Adjuvant Therapy for Melanoma." **Current Oncology Reports** 19.5 (2017): 36. Web.
- AGRA, M. DE F.; FREITAS, P. F. DE; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, mar. 2007.
- AHMED, B.; QADIR, M. I.; GHAFOR, S. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v. 30, n. 4, p. 291–297, 2020.

AKULA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, nov. 2011.

AL-BADR, A. A.; ALODHAIB, M. M. Dacarbazine. Em: **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. [s.l.] Elsevier, 2016. v. 41p. 323–377.

ATANASOV, A.G., ZOTCHEV, S.B., DIRSCH, V.M. *et al.* Produtos naturais na descoberta de drogas: avanços e oportunidades. **Nat Rev Drug Discov** **20**, 200–216 (2021).

BAHADO-SINGH, P. S. Wound Healing Potential of *Tillandsia recurvata* and Guaiacum officinale in Streptozotocin Induced Type 1 Diabetic Rats. **American Journal of Biomedical and Life Sciences**, v. 2, n. 6, p. 146, 2014.

BARROS, F. *et al.* Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 2, p. 305–312, set. 2013.

BELOW J, M DAS J. Vincristine. 2020 Oct 13. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 30725807.

BERGERS, G.; FENDT, S.-M. The metabolism of cancer cells during metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 3, p. 162–180, mar. 2021.

BIRKBAK, N. J.; MCGRANAHAN, N. Cancer Genome Evolutionary Trajectories in Metastasis. **Cancer Cell**, v. 37, n. 1, p. 8–19, jan. 2020.

BRANDT, M. G.; MOORE, C. C. Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 1–13, fev. 2019.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

Cabrera GM, Gallo M, Seldes AM. Cycloartane derivatives from *Tillandsia usneoides*. **Journal of natural products**. 1996; 59:343-7.

CABRERA GM, SELDES AM. Hydroperoxycycloartanes from *Tillandsia recurvata*. **Journal of natural products**. 1995; 58:1920-4.

CASTRO, D. T. H. et al. Ethanolic Extract of *Senna velutina* Roots: Chemical Composition, *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Effects, and B16F10-Nex2 Melanoma Cell Death Mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–14, 12 jun. 2019.

Causes of death. **World Health Organization (WHO)**, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/data/maternal-newborn-child-adolescent/monitor>>. Acesso em: 6 set. 2020.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563–572, ago. 2002.

Chemotherapy for Acute Lymphocytic Leukemia (ALL). **American Cancer Society**, 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/treating/chemotherapy.html>>. Acesso em: 6 set. 2020.

CHEN, G. et al. Polymeric micelleplexes for improved photothermal endosomal escape and delivery of siRNA. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 29, n. 10, p. 2593–2600, out. 2018.

COPUR MS, MANAPURAM S. Multiple Primary Tumors Over a Lifetime. **Oncology** (Williston Park). 2019 Jul 16;33(7):629384. PMID: 31365752.

CURTI, B. D.; FARIES, M. B. Recent Advances in the Treatment of Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 23, p. 2229–2240, 10 jun. 2021.

Dacarbazine , In LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. **National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases**, 2017.

DAVIS, L. E.; SHALIN, S. C.; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy**, v. 20, n. 11, p. 1366–1379, 2 nov. 2019.

DE QUEIROGA, M. A. et al. Chemical constituents from *Tillandsia recurvata*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3–4, p. 423–425, jun. 2004.

DELAPORTE, R. H. et al. Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker – Bromeliaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 229–233, dez. 2004.

DENG, L. et al. Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 2, p. 493–508, ago. 2020.

ESPOSITO, M.; GANESAN, S.; KANG, Y. Emerging strategies for treating metastasis. **Nature Cancer**, v. 2, n. 3, p. 258–270, mar. 2021.

ESTRELLA-PARRA, E.; FLORES-CRUZ, M.; BLANCAS-FLORES, G.; KOCH, S. D.; ALARCÓN-AGUILAR, F. J. The *Tillandsia* Genus: History, Uses, Chemistry, and Biological Activ. Bol. Latinoam. Caribe Plant. **Med. Aromat.** 2019, 18, 239–264.

FAN, Y. et al. Accelerated Solvent Extraction of Antioxidant Compounds from Gardeniae Fructus and Its Acetylcholinesterase Inhibitory and PC12 Cell Protective Activities. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2805, 15 nov. 2021.

FARES, J., FARES, M. Y., KHACHFE, H. H., SALHAB, H. A., & FARES, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal transduction and targeted therapy**, 5(1), 28, 2020.

GEORGESCU, S. R. et al. Tumour Microenvironment in Skin Carcinogenesis. Em: BIRBRAIR, A. (Ed.). **Tumor Microenvironments in Organs**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2020. v. 1226p. 123–142.

GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data. **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Disponível em < <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data> > Acesso 02 de out 2022.

GONZALEZ, A. et al. Extraction and Identification of Volatile Organic Compounds in Scentless Flowers of 14 Tillandsia Species Using HS-SPME/GC-MS. **Metabolites**, v. 12, n. 7, p. 628, 8 jul. 2022.

GORDON, R. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 160–169, ago. 2013.

GRACIANO, C.L, FERNÁNDEZ, V. CALDIZ, D.O. *Tillandsia recurvata* L. as a bioindicator of sulfur atmospheric pollution. **Ecología austral**. v. 13. p. 3 – 14, 2003

GRAHAM, T. A.; SOTTORIVA, A. Measuring cancer evolution from the genome: Measuring cancer evolution. **The Journal of Pathology**, v. 241, n. 2, p. 183–191, jan. 2017.

HAQUE, F. et al. Extraction and applications of cyanotoxins and other cyanobacterial secondary metabolites. **Chemosphere**, v. 183, p. 164–175, set. 2017.

HUANG, M.; LU, J.-J.; DING, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, n. 1, p. 5–13, fev. 2021.

JONES, W. P.; KINGHORN, A. D. Extraction of Plant Secondary Metabolites. Em: SARKER, S. D.; NAHAR, L. (Eds.). **Natural Products Isolation**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 864p. 341–366.

KITTLER, H. Evolution of the Clinical, Dermoscopic and Pathologic Diagnosis of Melanoma. **Dermatology Practical & Conceptual**, p. 2021163S, 28 jul. 2021.

KRUSHKAL, J. et al. Molecular genomic features associated with in vitro response of the NCI-60 cancer cell line panel to natural products. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 2, p. 381–406, fev. 2021.

LaBerge GS, Duvall E, Grasmick Z, Haedicke K, Galan A, Leverett J, Baswan S, Yim S, Pawelek J. Recent Advances in Studies of Skin Color and Skin Cancer. **Yale J Biol Med**. 2020 Mar 27;93(1):69-80. PMID: 32226338; PMCID: PMC7087065.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, fev. 2017.

LEITER, U.; KEIM, U.; GARBE, C. Epidemiology of Skin Cancer: Update 2019. Em: REICHRATH, J. (Ed.). Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Cham: Springer International Publishing, 2020. v. 1268p. 123–139.

LI, X. et al. Anticancer efficiency of cycloartane triterpenoid derivatives isolated from *Cimicifuga yunnanensis* Hsiao on triple-negative breast cancer cells. **Cancer Management and Research**, v. Volume 10, p. 6715–6729, dez. 2018.

LI, Y. et al. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80–89, mar. 2020.

LINARES, M. A.; ZAKARIA, A.; NIZRAN, P. Skin Cancer. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 42, n. 4, p. 645–659, dez. 2015.

LIU, Y. et al. Cellular senescence and cancer: Focusing on traditional Chinese medicine and natural products. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 10, out. 2020.

LIU, Y.; SHEIKH, M. S. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. **Molecular and cellular pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 228, 2014.

LOWE H. *Jamaica Patent No: US Patent 2010*

LOWE HI, TOYANG NJ, BRYANT J. In vitro and in vivo anti-cancer effects of *Tillandsia recurvata* (ball moss) from Jamaica. **West Indian Med J**. 2013 Mar;62(3):177-80. PMID: 24564035.

LOWE HI, WATSON CT, BADAL S, ET AL. Kinase Inhibition by the Jamaican Ball Moss, *Tillandsia recurvata* L. Anticancer research. 2012; 32:4419-22.

Lowe, H. (2014). Cycloartanes with Anticancer Activity Demonstrate Promising inhibition of the Mrck α and Mrck β Kinases. **British Journal of Medicine and Medical Research**, 4(9), 1802-1811.

LOWE, H. et al. Anti-angiogenic properties of the Jamaican ball moss, (*Tillandsia recurvata* L.). **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, 1 jan. 2012.

LOWE, H. I. C. et al. Cycloartane-3,24,25-triol inhibits MRCK α kinase and demonstrates promising anti prostate cancer activity in vitro. **Cancer Cell International**, v. 12, n. 1, p. 46, dez. 2012.

LOWE, H. I. C. et al. HLBT-100: a highly potent anti-cancer flavanone from *Tillandsia recurvata* (L.) L. **Cancer Cell International**, v. 17, n. 1, p. 38, dez. 2017.

LOWE, H. Unearthing the Medicinal Properties of *Tillandsia recurvata* (Ball Moss): A Mini Review. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 9, p. 1138–1149, 10 jan. 2014.

LOWE, H., TOYANG, N., WATSON, C., AYEAH, K., & BRYANT, J. (2014). Antileukemic Activity of *Tillandsia recurvata* and Some of its Cycloartanes. **Anticancer Research**, 34(7), 3505-3509.

LOWE, HENRY IC ET AL. “In Vitro Anticancer Activity of the Crude Extract and two Dicinnamate Isolates from the Jamaican Ball Moss (*Tillandsia Recurvata* L.).” **American international journal of contemporary research** vol. 3,1 (2013): 93-96.

MAJIDPOOR, J.; MORTEZAEI, K. Steps in metastasis: an updated review. **Medical Oncology**, v. 38, n. 1, p. 3, jan. 2021.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE JR., A. Metabólitos secundários da família bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885–1897, 2009.

MATTILA, K. E. et al. Combination chemotherapy with temozolomide, lomustine, vincristine and interferon-alpha (TOL-IFN) plus vemurafenib or TOL-IFN as first-line treatment for patients with advanced melanoma. **Acta Oncologica**, v. 59, n. 3, p. 310–314, 3 mar. 2020.

MEIRSON, T.; GIL-HENN, H.; SAMSON, A. O. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. **Oncogene**, v. 39, n. 9, p. 2024–2026, fev. 2020.

MENDES, R. L. Morfologia e regimes de crescimento das linhagens celulares derivadas de melanoma murino B16F10, primário e metastático, em camundongos balb/c. Tese (Doutorado) – **Universidade Federal de Viçosa**. Minas Gerais, p. 134, 2011.

MISHRA, H., MISHRA, P.K., EKIELSKI, A. *et al.* Tratamento de melanoma: do convencional à nanotecnologia. **J Cancer Res Clin Oncol** 144, 2283-2302 (2018)

MOHANTY, R. *et al.* CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment (Review). **Oncology Reports**, 24 set. 2019.

N. NWODO, J. *et al.* Exploring Cancer Therapeutics with Natural Products from African Medicinal Plants, Part II: Alkaloids, Terpenoids and Flavonoids. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 108–127, 2 nov. 2015.

NEVES, Úrsula. Brasil deve registrar 185,6 mil novos casos de câncer de pele em 2022, segundo estimativas do INCA. PEBMED, 2022. Disponível em <<https://pebmed.com.br/brasil-deve-registrar-1856-mil-novos-casos-de-cancer-de-pele-em-2022-segundo-estimativas-do-inca/>> Acesso em: 12 de outubro de 2022

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., & SNADER, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of natural products**, 66(7), 1022–1037.

O que causa o câncer? | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-cause-cancer>>. Acesso em: 15 set. 2022.

PAREDES-GAMERO, E. J., MARTINS, M. N., CAPPABIANCO, F. A., IDE, J. S., MIRANDA, A. 2012. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. v.1820, pp.1062-1072.

PATEL, S. A. *et al.* Genomic control of metastasis. **British Journal of Cancer**, v. 124, n. 1, p. 3–12, 5 jan. 2021.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 52–79, jun. 2015.

PÉREZ-LÓPEZ, M. et al. Anti-virulence activities of some *Tillandsia* species (Bromeliaceae). **Botanical Sciences**, v. 98, n. 1, p. 117–127, 11 mar. 2020.

PINTO, J. S. S.; LANÇAS, F. M. Design, construction and evaluation of a simple pressurized solvent extraction system. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 913–917, 2009.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, nov. 2013.

SAGINALA, K. et al. Epidemiology of Melanoma. **Medical Sciences**, v. 9, n. 4, p. 63, 20 out. 2021.

SANTOS SILVA, J. et al. Four new cycloartane-type triterpenoids from the leaves of *Combretum mellifluum* Eichler: assessment of their antioxidant and antileishmanial activities. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 85, n. 9, p. 364–375, 3 maio 2022.

SCHILITZ, A. O.C., LIMA, F. C. S., OLIVEIRA, J. F. P., SANTOS, M. O., REBELO, M. S. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / **Instituto Nacional de Câncer**. José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019

SCHINZARI, G. et al. Cisplatin, dacarbazine and vinblastine as first line chemotherapy for liver metastatic uveal melanoma in the era of immunotherapy: a single institution phase II study. **Melanoma Research**, v. 27, n. 6, p. 591–595, dez. 2017.

SHASTRI, A.; SHASTRI, S. S. Cancer screening and prevention in low-resource settings. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 12, p. 822–829, dez. 2014.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7. ed. PORTO ALEGRE: ARTMED, 2017. 930 p.

SOLANO, F. Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1537, 27 mar. 2020.

SOQUETTA, MARCELA BROMBERGER. Metodologias não convencionais na extração de compostos bioativos de casca de bergamota. 2019. **Tese de Doutorado em Engenharia Química**, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS).

SUN, H. et al. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1237, p. 1–23, maio 2012.

SUNDARARAJAN, S. et al. Metastatic Melanoma. Em: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

TARDIVO, R.C.; ARAÚJO, C.C.; PAIXÃO SOUZA, B. *Tillandsia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB6361>>. Acesso em: 03 nov. 2022

Tillandsia recurvata – Cravo do Mato. Biologia da Paisagem. Pampulha – Belo Horizonte, 20 de maio de 2022. Disponível em <<https://biologiadapaisagem.com.br/2022/05/20/tillandsia-recurvata-cravo-do-mato/>> Acessado em 07 de set de 2022

VASCONCELOS, A. L., VASCONCELOS, A. L., XIMENES, E. A., RANDAU, K. P., "***Tillandsia Recurvata* L. (Bromeliaceae): Aspectos Farmacognósticos.**" Revista De Ciências Farmacêuticas Básica E Aplicada 34, no. 2 (2013): 151-59.

VENDRAMIN, R.; LITCHFIELD, K.; SWANTON, C. Cancer evolution: Darwin and beyond. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 18, 15 set. 2021.

VOGT, A. et al. Multiple primary tumours: challenges and approaches, a review. **ESMO Open**, v. 2, n. 2, p. e000172, 2017.

WAGSTAFF, W. et al. Melanoma: Molecular genetics, metastasis, targeted therapies, immunotherapies, and therapeutic resistance. **Genes & Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1608–1623, nov. 2022.

WANG, J.-J.; LEI, K.-F.; HAN, F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **European Review for medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 12, p. 3855–3864, jun. 2018.

WATSON, M.; HOLMAN, D. M.; MAGUIRE-EISEN, M. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. *Seminars in Oncology Nursing*, v. 32, n. 3, p. 241–254, ago. 2016.

WFO (2022): *Tillandsia recurvata* (L.) L. Published on the Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000583812>. Acessado em: 09 de set 2022

Why you should know about melanoma. American Cancer Society, 2017. Disponível em <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/cancer-control/en/booklets-flyers/why-you-should-know-about-melanoma-handout.pdf>> Acesso em: 11 de outubro de 2022

WITHERUP, K. M. et al. Identification of 3-Hydroxy-3-methylglutaric Acid (HMG) as a Hypoglycemic Principle of Spanish Moss (*Tillandsia usneoides*). **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 8, p. 1285–1290, ago. 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Fev. 2022. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ultraviolet radiation. Jun. 2022. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ultraviolet-radiation>>.

XIA, H.-M.; DAI, Y.-P.; SUN, L.-L. Research progress on cycloartane triterpenoids of *Actaea*. **China journal of Chinese materia medica**, v. 43, p. 4000–4010, 1 out. 2018.

YOUN, U. J. et al. Anti-inflammatory triterpenes from the apical bud of *Gardenia sootensis*. **Fitoterapia**, v. 114, p. 92–97, out. 2016.

ZHU, L.; CHEN, L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 24, n. 1, p. 40, dez. 2019.