

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Paula Pellenz Tomasini

**Análise do Óleo Essencial de *Piper
gaudichaudianum* na Citotoxicidade
da Doxorubicina**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2018

Paula Pellenz Tomasini

Análise do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* na citotoxicidade da doxorubicina

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra. Dinara Jaqueline Moura

**Porto Alegre
2018**

Catálogo na Publicação

Tomasini, Paula Pellenz

Análise do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* na citotoxicidade da doxorubicina / Paula Pellenz Tomasini. -- 2018.

50 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2018.

Orientador(a): Prof. Dra. Dinara Jaqueline Moura.

1. Óleo essencial. 2. Doxorubicina. 3. Antitumoral. 4. Produto natural. 5. Sesquiterpenos. I. Título.

Agradecimentos

À minha amada família e queridos amigos, por todo incentivo que recebi ao longo desses anos de estudo, mas principalmente pela minha avó Benícia Teodora da Silva Pellenz, que não teve a mesma oportunidade que eu na vida, mas que me ensinou o valor do estudo e do trabalho, com muita humildade.

À Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, pela convivência com excelentes profissionais, pela infraestrutura, pela minha formação de qualidade.

À minha orientadora, Dinara Jaqueline Moura, pelo incentivo ao crescimento científico, pelas horas de estudo que me foram cobradas, por cada artigo lido ao longo desses vários anos e pela confiança. As cobranças só contribuíram para o meu aperfeiçoamento. Agradeço muito pela oportunidade de ter tido uma formação crítica e autônoma. A aprendizagem é um bem que se leva para a vida toda e eu pretendo perpetuá-la repassando para novas gerações.

Aos colegas do Laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA, pela ajuda nos experimentos, pelas trocas de ideias, pelas críticas construtivas, pela companhia, pelo apoio, por serem plateia cheia nos momentos de apresentações.

À professora Jenifer Saffi, coordenadora do laboratório de Genética Toxicológica, que me acolheu desde a Iniciação Científica e possibilitou meu início na pesquisa. E aos demais professores, terceirizados e técnicos administrativos da UFCSPA pela colaboração. Muito obrigada a todos!

Sumário

1. Introdução	7
1.1. A problemática do câncer	7
1.2. Câncer de mama	10
1.3. Doxorrubicina	11
1.4. Novas abordagens de tratamento	14
1.4.1. Plantas medicinais	14
1.4.2. Família Piperaceae	15
1.4.2.1. <i>Piper gaudichaudianum</i>	16
1.4.3. O óleo essencial da <i>P. gadichaudianum</i> e seus componentes majoritários	17
1.5. Mecanismo de ação dos óleos essenciais	22
1.6. Nanoemulsão lipídica	24
1.7. Justificativa	25
1.8. Referências Bibliográficas	27
2. Objetivos	33
3. Artigo científico	35
4. Considerações finais e perspectivas	45
5. Anexo	47

Lista de abreviaturas

ABC - *ATP-binding cassette*

ATP – Adenosina trifosfato

Akt - proteína quinase B

ANOVA - *Analysis of Variance*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNA Topo II – enzima DNA Topoisomerase II

DOX – Doxorrubicina

ER – Receptor de estrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FDA – *Food and Drug Administration*

GATA4 - *GATA binding protein 4*

HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MDR1 - multidrug resistance protein 1

MRP1 - multidrug resistance-associated protein 1

OMS – organização mundial de saúde

p38 - *p38 kinase*

p53 - *tumor protein p53*

P. gaudichaudianum - Piper gaudichaudianum Kunth

P-gp – glicoproteína P

PR – Receptor de progesterona

PBS – *Phosphate-Buffered Saline*

SOD – enzima superóxido dismutase

Resumo da Dissertação

Introdução: A doxorubicina é um dos principais quimioterápicos utilizado para tratar o câncer de mama, porém causa muitos efeitos adversos devido a danos oxidativos em células não tumorais, que geram inflamação e dor. Além disso, seu uso é limitado pelo efeito cardiotóxico e por mecanismos de resistência tumoral à quimioterapia, que dificultam a eficiência do tratamento. Neste sentido, existe a necessidade de buscar terapias adjuvantes que possam combater esses efeitos adversos e aumentar a eficiência da doxorubicina. A *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) é uma planta medicinal com promissora atividade adjuvante na quimioterapia, pois seu óleo essencial é composto por sesquiterpenos que possuem atividade antitumoral, analgésica e anti-inflamatória.

Objetivos: Avaliar o efeito modulador do óleo essencial da *Piper gaudichaudianum* na citotoxicidade da doxorubicina.

Material e métodos: O óleo essencial das folhas secas da planta foi obtido por hidrodestilação e a composição dele foi analisada por GC-MS. A atividade *scavenger* de radicais livres foi avaliada pelo ensaio com DPPH. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em tratamento de 96 horas em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF7) e de cardiomiócito embrionário de rato (H9C2) e avaliados por azul de trypan. A geração de superóxido foi medida por marcação fluorescente com mitoSOX. O perfil de morte celular foi analisado por marcação fluorescente com anexina V-FITC e PI. O acúmulo de doxorubicina intracelular foi medido pela leitura da autofluorescência da droga. Todas as leituras de fluorescência foram feitas em citometria de fluxo.

Resultados: O óleo mostrou ser composto principalmente por (E)-nerolidol, (E)-cariofileno e α -humuleno e possuir atividade antioxidante. Quando testado em cultura celular, ele apresentou atividade antitumoral na linhagem MCF7 tratada por 96 horas, sem aumentar a geração de superóxido em 16 horas nessas células. Além disso, mostrou não ser citotóxico na linhagem não-tumoral H9C2 em 96 horas. Interessantemente, ele mostrou aumentar a citotoxicidade da doxorrubicina em células MCF7 em 96 horas de tratamento e aumentar o acúmulo intracelular desse quimioterápico em 6 horas de tratamento.

Conclusão: O óleo essencial da *P. gaudichaudianum* parece ser um bom candidato a adjuvante na quimioterapia com doxorrubicina.

Palavras-chave: óleo essencial, sesquiterpenos, antitumoral, doxorrubicina.

1. Introdução

1.1. A problemática do câncer

O câncer pode ser definido como uma doença das células, manifestando-se como uma desordem na função ou na expressão de genes importantes, como consequência de uma série de agressões provocadas por fatores ambientais, comportamentais ou hereditários (Mills e Rieger, 2006). Devido a essas alterações, as células têm suas propriedades alteradas de forma permanente, sendo estas transmitidas às suas descendentes. Os principais mecanismos que influenciam a morfologia tumoral são a alta taxa de mitose das células, o decréscimo da adesão celular e as características do ambiente local de desenvolvimento. O câncer em qualquer lugar do corpo é uma doença que constitui um risco potencial à vida, pois as células cancerosas podem fazer metástase, espalhando-se aos órgãos vitais, afetando, dessa forma, seu funcionamento normal (Speechley e cols., 2000).

O câncer pode ser tratado de diversas formas, todas dependendo do tipo e localização do tumor. As principais modalidades terapêuticas incluem: (I) cirurgias para remoção de tumores sólidos e das regiões adjacentes a estes; (II) tratamento radioterápico onde se utilizam feixes de radiação ionizante dirigidos sobre o local onde o câncer se encontra e; (III) o tratamento quimioterápico empregando drogas que podem exterminar ou impedir o crescimento tumoral (Fernandes Jr., 2000). Também fazem parte do tratamento, em alguns casos, a terapia hormonal, a imunoterapias, o

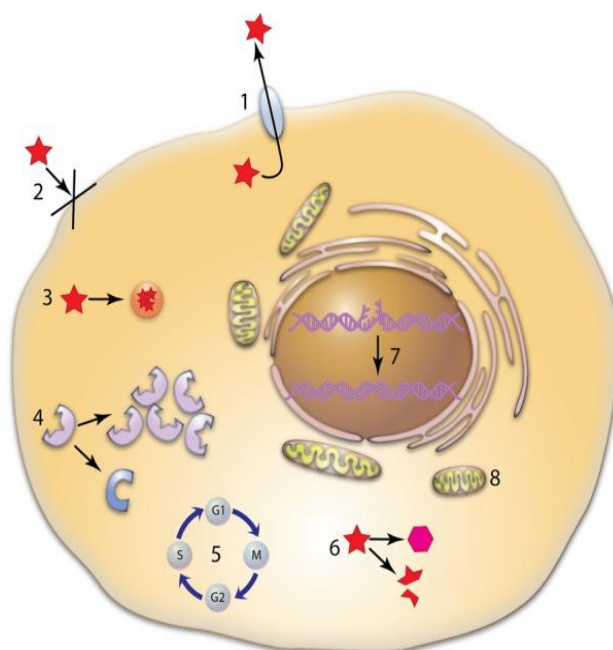
transplante de medula óssea e o uso de medicamentos que auxiliam no controle dos efeitos adversos (antieméticos, antiinflamatórios, analgésicos, , opióides corticóides) (Instituto Oncoguia, 2018).

A resistência tumoral é atualmente um dos maiores empecilhos para o bom resultado da quimioterapia no tratamento de alguns tipos de tumores, pois através dela as células cancerosas desenvolvem mecanismos que impedem o bom funcionamento dos agentes antitumorais, resultando no insucesso do tratamento (Huber e cols., 2010). Outro problema frequentemente associado à terapia antitumoral está relacionado aos efeitos colaterais destes medicamentos. Considerando estes dois fatores, há a necessidade de encontrar alternativas terapêuticas que ofereçam uma toxicidade colateral menor que os agentes quimioterápicos usados atualmente, que sejam mais efetivos ou que atuem como adjuvantes, reforçando os esquemas terapêuticos (Bhalla e cols., 2013).

Segundo Huber e cols. (2010), existem vários mecanismos de resistência tumoral a múltiplas drogas, tais como: transporte através da membrana, alteração nas enzimas-alvo, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e incapacidade de sofrer apoptose (Figura 1). Entretanto, a principal forma de resistência parece estar associada ao transporte através da membrana. As células com resistência a múltiplas drogas têm aumento da expressão de algumas proteínas da superfamília ABC (*ATP-binding cassette*). Em mamíferos o gene *MDR1* (*multidrug resistance protein 1*) está envolvido com a resistência a múltiplas drogas, através da expressão da glicoproteína-P (170-kDa), que promove o efluxo do quimioterápico utilizando energia da hidrólise do ATP (Figura 2) (Huber e cols., 2010). Além da

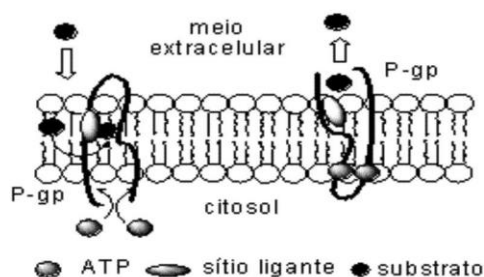
glicoproteína-P, as células tumorais de mamíferos utilizam a glicoproteína MRP1 (*multidrug resistance-associated protein 1*) para expulsar drogas citotóxicas, que parece ter um substrato menos específico que a glicoproteína-P (Di Pietro e cols., 1999).

Figura 1. Mecanismos de resistência a drogas em células cancerígenas. (1) efluxo de drogas por transportadores; (2) perda de receptores de superfície celular e/ou transportadores de fármacos ou alterações na composição lipídica da membrana; (3) compartimentalização da droga em vesículas celulares; (4) alteração ou aumento de alvos de drogas; (5) alterações no ciclo celular; (6) aumento do metabolismo de drogas/inativação enzimática; (7) reparação de danos; e (8) inibição da apoptose.



Fonte: Alakhova e Kabanov (2014).

Figura 2. Modelo de Higgins para a atuação da P-gp como flipase.



Fonte: Huber et al. (2010).

Os efeitos colaterais ocasionados pelos quimioterápicos relacionam-se à sua não especificidade pelas células tumorais (Rahman e Hasan, 2015). Esses efeitos predominam nas células de rápida divisão celular, como as do tecido hematopoiético, do tecido germinativo, do folículo piloso, do revestimento gastrointestinal e alguns outros órgãos que podem ser afetados em maior ou menor grau, de forma precoce ou tardia, aguda ou crônica, cumulativa e irreversível. Cada quimioterápico tem seu perfil de toxicidade e efeitos colaterais, ressaltando-se a necessidade do uso racional de drogas para evitar os efeitos adversos acumulativos (Damia e Garattini, 2014). Os efeitos adversos dos quimioterápicos apresentam frequência e intensidade variadas de acordo com as drogas utilizadas, e podem ser divididos em toxicidade não hematológica, em que estão incluídas as toxicidades gastrointestinais, pulmonares, cardíacas, hepáticas, neurológicas, renais, vesicais, dermatológicas, disfunções reprodutivas, alterações metabólicas, reações alérgicas e a fadiga; além da toxicidade hematológica, que engloba leucopenia, anemia, trombocitopenia e neutropenia febril (Bonassa, 2005).

1.2. Câncer de mama

Entre as mulheres, o câncer de mama é o câncer mais comum no Brasil e no mundo, depois do câncer de pele não melanoma. Para cada ano do biênio 2018-2019 são estimados 59.700 casos novos de câncer de mama, no Brasil, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres brasileiras (INCA, 2018).

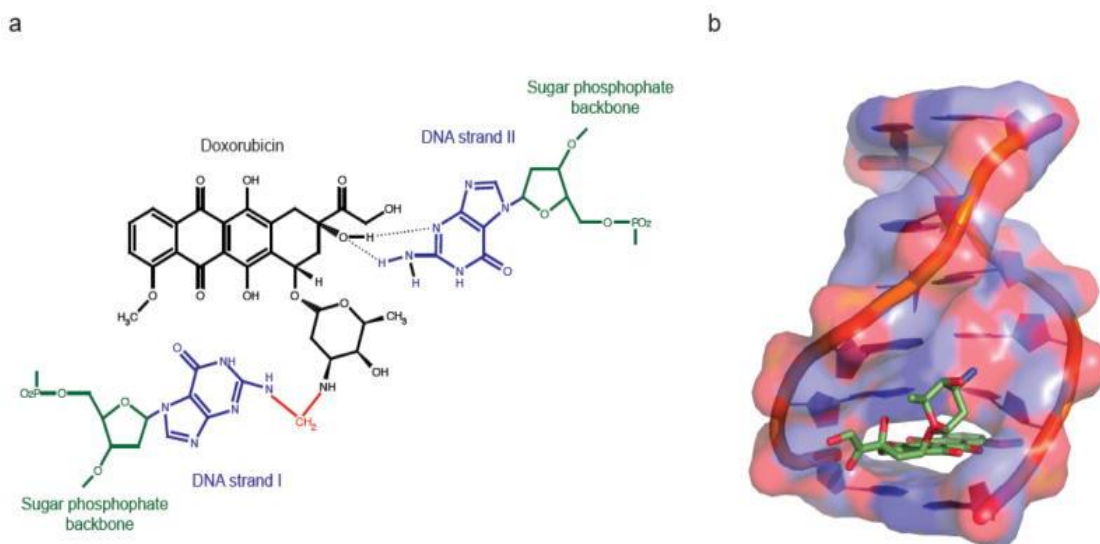
O câncer de mama pode ser classificado conforme o seguinte perfil molecular: receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR) positivos; receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2/neu) positivo; ER, PR e HER2/neu negativos (triplo negativo). A presença ou ausência desses receptores é importante para determinar o prognóstico e a terapia (Sørli e cols., 2001). Tumores que apresentam receptores de hormônio podem fazer terapia endócrina com tamoxifeno, que produz metabólitos com afinidade para ER, inibindo o crescimento de células responsivas a esse hormônio (Zembutsu, 2015). Caso o tumor progrida, eles se tornam candidatos à quimioterapia citotóxica, assim como os pacientes com tumores que não expressam receptores de hormônios ou com metástase visceral. A doxorrubicina é um dos principais quimioterápicos utilizados nesse caso, tanto em monoterapia como em terapia combinada, porém apresenta elevada toxicidade (Wilcken e Dear, 2008).

1.3. Doxorrubicina

Entre as principais classes de antineoplásicos estão as drogas que têm como alvo a enzima DNA topoisomerase II (DNA Topo II), que incluem as antraciclinas, medicamentos amplamente utilizados no tratamento

quimioterápico. As antraciclinas foram descobertas em 1960 através do isolamento da doxorrubicina, a partir da bactéria *Streptomyces peucetiuscaesius*. Todas as antraciclinas consistem de um anel aglicona acoplado a um amino-açúcar que pode intercalar-se no DNA (Patel e cols., 2013). A doxorrubicina (Figura 3), um antibiótico antracíclico com atividade antitumoral (Carvalho e cols, 2014), é amplamente utilizada para tratar o câncer de mama, sendo efetivo tanto para os estágios iniciais deste tipo de câncer, quanto para a metástase, porém seu uso é limitado pelo efeito cardiotoxico, que pode ser tanto agudo e reversível, quanto tardio e fatal (Lao e cols., 2013). Além da inibição da DNA Topo II que resulta na ruptura das fitas de DNA, a doxorrubicina induz a inibição da síntese de proteínas e replicação de DNA pela capacidade de intercalar-se ao DNA, assim como pela geração de espécies reativas de oxigênio, levando a danos oxidativos no DNA e à peroxidação de lipídios (Minotti e cols., 2004).

Figura 3. Estrutura do complexo DNA-Doxorrubicina. (a) Doxorrubicina se liga covalentemente (em vermelho) com uma guanina em uma das fitas de DNA e forma pontes de hidrogênio com uma guanina da fita de DNA oposta. (b) Estrutura da Doxorrubicina intercalada no DNA.



Fonte: Yang e cols. (2014).

Em relação ao mecanismo de cardiotoxicidade, estudos indicam que processos de sinalização celular, tais como a ativação da p53 (*tumor protein* p53), decréscimo na atividade da proteína cinase B (Akt), aumento na atividade da p38 (p38 *kinase*), alteração na regulação da GATA4 (GATA *bindingprotein* 4) e heme oxigenase estão envolvidos na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (Yoshida e cols., 2009). Além disso, tem sido demonstrado que a geração de ERO está associada com apoptose, necrose e autofagia observada em cardiomiócitos de camundongos tratados com doxorubicina (Zhang e cols., 2009), sendo apontada como o principal mecanismo de cardiotoxicidade do quimioterápico. A toxicidade da doxorubicina no cardiomioblasto inclui despolarização mitocondrial, fragmentação e desorganização da rede mitocondrial (Vejpongsa e Yeh, 2014). O coração é muito suscetível aos danos oxidativos induzidos pela doxorubicina, devido à alta quantidade de mitocôndrias contidas nele, mas também é observada a toxicidade na

mitocôndria de outros tecidos como cérebro, pulmão e fígado (Carvalho e cols., 2014).

Além da cardiotoxicidade, outro problema do tratamento com doxorrubicina é resistência tumoral à quimioterapia. A resistência em células de mamíferos às drogas inibidoras da DNA Topo II é frequentemente associada à expressão reduzida das isoformas desta enzima, ou seja, a resistência seria mediada através da redução de danos no DNA mediados pela enzima e não através do aumento da sua atividade (Pommier e cols., 2010). Adicionalmente, o aumento nos mecanismos de reparo de DNA, assim como já mencionado anteriormente, e um aumento do efluxo da droga pelas proteínas de membrana também têm sido associados à resistência das células tumorais à doxorrubicina (Helleday e cols., 2008).

1.4. Novas abordagens de tratamento

1.4.1. Plantas medicinais

Considerando as projeções da OMS para o Brasil, a qual estima números anuais crescentes de casos novos de câncer, torna-se imprescindível a busca por novos medicamentos que resultem em redução das complicações associadas ao tratamento da doença.

Os produtos naturais têm sido incluídos como fonte potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos. Um número crescente de compostos extraídos de fontes naturais, principalmente metabólitos secundários, está atualmente em desenvolvimento pré-clínico ou clínico. São

exemplos de metabólitos secundários de plantas com propriedade anticancerígena testados clinicamente: paclitaxel, genisteína, licopeno e resveratrol (Buyel, 2018). O paclitaxel, por exemplo, foi aprovado para uso em 1992, pela *United State Food and Drug Administration (FDA)*, e vem sendo usado para tratar câncer de ovário, mama, pâncreas entre outros. O paclitaxel é um diterpeno tricíclico isolado da casca de *Taxus brevifolia* Nutt e tem tido sucesso clínico, o que motiva novas pesquisas com plantas medicinais em busca de novos compostos (Seca e Pinto, 2018). Na área do câncer, no período de 1940 a 2014, aproximadamente 50% das moléculas aprovadas são produtos de origem natural (vegetal, marinho, micro-organismos, entre outros) ou derivados (Newman e Cragg, 2016).

1.4.2. Família Piperaceae

Uma família de planta importante comercialmente e farmacologicamente é a Piperaceae. Esta família compreende aproximadamente três mil espécies distribuídas em oito gêneros, dos quais se destacam os gêneros Piper, Peperomia e Pothomorphe. São plantas de ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Argentina, Paraguai e nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil. No Brasil, existem aproximadamente 460 espécies distribuídas em cinco gêneros, muitas delas extremamente comuns na Mata Atlântica, onde ocorrem em abundância e diversidade (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002). Este grande número de espécies caracteriza-se pelo uso medicinal popular e pela importância econômica e comercial, devido à produção de óleos essenciais

utilizados pela indústria de condimentos, indústria farmacêutica e pela indústria de inseticidas (Silva e Machado, 1999).

O gênero *Piper* é o mais estudado e conhecido do ponto de vista químico, com destaque especial a espécie da pimenta, *Piper nigrum*, e espécies medicinais de ampla utilização, como a *Piper betle*, *Piper longum*, *Piper angustifolium*, *Piper methysticum*, assim como outras de grande importância em sistemas tradicionais da medicina, como a chinesa e aiurvédica (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002). Outra planta desta família que tem recebido destaque é a *Piper gaudichaudianum* Kunth, que se desenvolve abundantemente em toda a Mata Atlântica, sendo conhecida como pariparoba no Sul do Brasil e jaborandi falso ou iaborandi nas outras partes do país (Péres e cols., 2009).

1.4.2.1. *Piper gaudichaudianum*

A *P. gaudichaudianum* é um arbusto de pequeno porte, com folhas curto-pecioladas, membranáceas, um pouco ásperas, acuminadas no ápice, assimétricas na base, com inflorescência tipo espiga, levemente curvadas, chegando a alcançar oito centímetros de comprimento (Figura 4) (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002). A maioria das espécies desse gênero não tem valor econômico, embora apresentem uma grande importância ecológica dentro de seu habitat natural, principalmente nas florestas úmidas. As folhas das plantas do gênero *Piper* servem de alimentos para insetos enquanto que os frutos nutrem uma variedade de animais, incluindo morcegos e pássaros (Nascimento, 2011).

Figura 4. Arbusto característico de *P. gaudichaudianum*.



Fonte: Sperotto e cols. (2012).

Na região da Mata Atlântica, tanto a infusão das folhas, como as folhas frescas da *P. gaudichaudianum* são utilizadas popularmente para aliviar a dor de dente, ao passo que as raízes frescas são mastigadas como anti-inflamatório e no tratamento de distúrbios hepáticos (Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002). Um dos componentes estudados dessa espécie é o óleo essencial extraído de suas folhas, caracterizado como composto complexo, constituído por moléculas de baixo peso molecular, com odor forte e com alta volatilidade (Bakkali e cols., 2008; Noorizadeh e cols., 2011).

1.4.3. O óleo essencial da *P. gaudichaudianum* e seus componentes majoritários

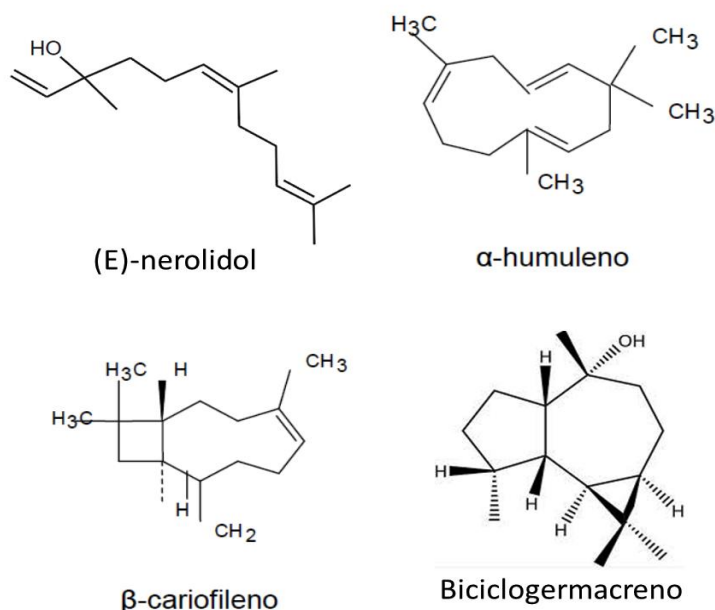
Óleos essenciais são moléculas com alta volatilidade, odorizadas e sintetizadas por células secretoras de plantas aromáticas (Bayala e cols., 2014). Os óleos essenciais, por definição, são produzidos tanto por destilação

a vapor ou destilação seca ou ainda por meio de um tratamento mecânico, a partir de uma única espécie. Produtos obtidos por outros métodos de extração, como solventes, não são considerados óleos essenciais (Baser e Buchbauer, 2010).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos através dos metabólitos primários das plantas. Os metabólitos secundários são moléculas orgânicas de tamanho pequeno e que podem ser classificados em três principais grupos conforme a via pela qual são sintetizados: terpenos, fenóis e alcaloides (Seca e Pinto, 2018). Os terpenos são formados por unidades de isoprenos, que contêm 5 carbonos e são também chamados de hemiterpenos. Os terpenos contêm múltiplos de 5 carbonos, sendo nomeados de monoterpenos quando possuem 10 carbonos, sesquiterpenos quando com 15 e diterpenos quando possuem 20 carbonos (Baser e Buchbauer, 2010; Beller, Lee e Katz, 2015).

Análises fitoquímicas indicam que 87,6% da composição do óleo essencial de *P. gaudichaudianum* é representada por sesquiterpenos, sendo os principais: (E)-nerolidol, α -humuleno, (E)-cariofileno e biciclogermacreno, representados na Figura 5 (Péres e cols., 2009; Sperotto e cols., 2013). Entre as atividades biológicas descritas para o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* inclui-se a atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (De Moraes e cols., 2007) e atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida krusei* (Morandim-Giannett e cols., 2010).

Figura 5. Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial da *P. gaudichaudianum*.



Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrou-se que o óleo essencial das folhas de *P. gaudichaudianum* apresenta citotoxicidade aguda e dose-dependente em células de fibroblasto pulmonar de hamster chinês (linhagem V79), além de genotoxicidade e mutagênese (Péres e cols., 2009). Aprofundando o estudo do efeito do óleo essencial em células V79 foi visto que o mecanismo de ação compreende a geração de espécies reativas de oxigênio, despolarização mitocondrial e diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), causando morte por necrose e apoptose (Ramos e cols., 2015). Adicionalmente, foi demonstrado, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que o óleo essencial da *P. gaudichaudianum*, assim como seu composto majoritário (E)-nerolidol, não apresentam efeito mutagênico, mas induzem efeitos citotóxicos significativos, e que estes efeitos parecem estar relacionados à geração de

espécies reativas de oxigênio (ERO) (Sperotto e cols., 2013). Em estudo mais recente o óleo e seus componentes majoritários apresentaram citotoxicidade em células MCF7 (adenocarcinoma mamário humano) (Manini e cols, 2015).

O óleo essencial de plantas que contêm (E)-nerolidol apresenta atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, mostrando um efeito neuroprotetor contra danos por espécies reativas, além de efeito anticolinesterásico e antinociceptivo (Chan e cols., 2016; De Carvalho e cols., 2017). No estudo de Ko e cols. (2017), o óleo essencial de *Lindera erythrocarpa*, uma planta coreana usada popularmente para tratar desordens digestivas e dor, inibiu a produção de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos da linhagem RAW264.7. Esse óleo essencial é constituído de nerolidol (18.73 %), cariofileno (14.41 %), α -humuleno (7.73 %), semelhante ao óleo essencial de *P. gaudichaudianum*. Além disso, nerolidol também tem atividade antibacteriana em diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, causando disrupção da membrana celular, atividade antibiofilme, inseticida, antifúngica e antiparasítica (Chan e cols., 2016)

O β -cariofileno é um sesquiterpeno fitocanabinoide agonista do receptor canabinoide 2 (CB2), sem afinidade pelo receptor canabinoide 1 (CB1), com atividade anti-inflamatória demonstrada em diferentes modelos animais de dor (Poddighe e cols., 2018). Suas propriedades analgésicas demonstradas *in vivo* e antitumorais *in vitro* fazem dele um promissor fitoterápico na oncologia, já que a dor é um sintoma adverso comum na quimioterapia (Fidyt e cols., 2016).

Alfa-humuleno apresentou atividade anti-inflamatória em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 (Coté e cols., 2017). Também mostrou toxicidade aguda contra larva de três mosquitos: *Anopheles subpictus*, o vetor

da malária, *Aedes albopictus*, vetor da dengue e *Culex tritaeniorhynchus*, vetor da encefalite japonesa (Govindarajan e Benelli, 2016).

Interessantemente, a citotoxicidade em células tumorais dos componentes encontrados no óleo da *P. gaudichaudianum* também tem sido descrita. Nerolidol e α -humuleno induzem citotoxicidade em uma série de linhagens tumorais, incluindo linhagens de adenocarcinoma renal (ACHN), carcinoma de próstata hormônio dependente (LNCaP), melanoma melanócito (C32) e células MCF7 (Loizzo et al., 2007). O α -humuleno também apresentou citotoxicidade em células A549 (carcinoma de pulmão humano) e DLD1 (adenocarcinoma de cólon humano) em 48 horas de tratamento no estudo de Coté e cols. (2017). Em estudo de Thirugnanasampandan e David (2014), o composto cariofileno apresentou atividade antioxidante e citotóxica em células MCF7. O β -cariofileno também é capaz de aumentar a citotoxicidade de alguns quimioterápicos, como o paclitaxel, e do sesquiterpeno α -humuleno em células MCF7 (Legault e cols., 2007). Em outro estudo, os sesquiterpenos trans-nerolidol e α -humuleno demonstraram aumentar o acúmulo intracelular do quimioterápico doxorrubicina em células da linhagem Caco-2 (adenocarcinoma colorretal) sem aumentar o acúmulo desse quimioterápico em cultura primária de hepatócitos de rato (Ambroz e cols., 2015). Também aumentaram a eficácia da doxorrubicina em linhagens de câncer de ovário sensível e parcialmente resistente a doxorrubicina, A2780 e SKOV3 respectivamente, e em linhagem de câncer linfoblástico sensível a doxorrubicina (CCRF/CEM) (Ambroz e cols., 2017). O óleo essencial da planta brasileira *Zornia brasiliensis*, conhecida como carrapicho, que apresenta como principais constituintes os mesmos componentes majoritários encontrados no óleo da *P. gaudichaudianum* (48%

de trans-nerolidol, 9,3% de α -humuleno e 8,4% de β -cariofileno), apresentou citotoxicidade em 72 horas de tratamento em diferentes linhagens tumorais: B16F10 (melanoma de camundongo), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia promielocítica humana), e K562 (leucemia mielocítica crônica humana). O óleo de *Z. brasiliensis* apresentou maior citotoxicidade que os componentes majoritários individuais, mostrando possível efeito sinérgico dos componentes, e apresentou pouca toxicidade em célula não tumoral PBMCs (células mononucleares de sangue periférico humano ativadas com concanavalina A – linfoblasto humano). Quando testado *in vivo*, em camundongos injetados com células B16F10, 100 mg/kg do óleo essencial foram suficientes para diminuir o tamanho do tumor, em 9 dias de tratamento intraperitoneal (Costa e cols., 2015).

1.5. Mecanismo de ação dos óleos essenciais

A composição dos óleos essenciais é heterogênea, fazendo com que eles não tenham um único mecanismo de ação. Por isso, um mesmo óleo pode ter diferentes tipos de efeito em tumores diferentes (Baser e Buchbauer, 2010; Bayala e cols., 2014). Em geral, os componentes majoritários dos óleos essenciais são responsáveis por sua atividade biológica, mas deve-se considerar que mesmo os compostos presentes em menor quantidade tenham ação, uma vez que há a possibilidade de efeito sinérgico dos compostos (Baser e Buchbauer, 2010; Bayala e cols., 2014).

Sabe-se que os óleos essenciais têm a propriedade de gerar ERO intracelular e induzir apoptose. Por serem lipofílicos, os óleos essenciais

atravessam a membrana celular das células e podem danificar a membrana mitocondrial. Mudanças no fluxo de elétrons através da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial promovem a geração de radicais livres, que oxidam lipídios, proteínas e danificam o DNA, levando a morte por apoptose (Bayala e cols., 2014; Gautam, Mantha e Mittal, 2014; Russo e cols., 2015). Além disso, muitos óleos essenciais apresentam componentes antioxidantes que, ao interagirem com ERO, são convertidos em pró-oxidantes, tornando-se capazes de oxidar lipídio, proteínas e DNA (Bakkali e cols., 2008). Os terpenos contidos nos óleos essenciais proporcionam a atividade antioxidante (Bhalla e cols., 2013), sendo, como mencionado anteriormente, os componentes majoritários do óleo essencial da *P. gaudichaudianum* (Péres e cols., 2009). O efeito pró-oxidante tem demonstrado ser eficiente na redução da proliferação tumoral e parece não causar efeitos tóxicos ou mutagênicos nos tecidos saudáveis (Bakkali e cols., 2008). Outros mecanismos de citotoxicidade dos óleos essenciais e seus componentes incluem parada de ciclo celular, perda de função de organelas, efeito antimetastático, antiangiogênico e alteração em enzimas detoxificantes (Gautam, Mantha e Mittal, 2014; Russo e cols., 2015). Parte desses efeitos está relacionada com a propriedade lipofílica dos óleos essenciais e pelo baixo peso molecular de seus constituintes, que permitem que eles atravessem a membrana celular. Como consequência, a célula perde conteúdo do citoplasma, altera seu pH e perde potencial de membrana mitocondrial (Bhalla e cols., 2013; Russo e cols., 2015). Na Figura 6 estão representados os principais mecanismos associados à citotoxicidade dos óleos essenciais.

lipídica contendo paclitaxel foi formulada e apresentou semelhante atividade antitumoral in vivo comparada com a forma comercial de paclitaxel, Taxol, porém menor toxicidade aguda. Interessantemente, essa nanoemulsão não apresentou irritação intravenosa, nem hemólise de eritrócitos ou aglutinação, ao contrário da forma comercial Taxol. No estudo de Ahmad e cols. (2017) o óleo de peixe foi usado para englobar o quimioterápico taxoide DHA-SBT-1214 em uma nanoemulsão que foi capaz de superar a falta de especificidade tumoral no alojamento da droga dentro do corpo. Essa nanoemulsão pode ser administrada via intravenosa em doses altas e apresentou afinidade com proteínas do soro, o que permitiu uma maior circulação sanguínea e maior eficiência terapêutica, além de não ser tóxica ou irritante. A nanoemulsão de óleos essenciais e seus componentes isolados também tem mostrado ser uma boa formulação para potencializar o efeito dos mesmos (Periasamy e cols., 2016; Valdés e cols., 2016; Borges e cols., 2018). Muitos desses óleos essenciais têm atividade anti-inflamatória, analgésica e antitumoral relatada, sendo assim, poderiam ter papel adjuvante no controle de efeitos adversos de quimioterápicos. Dessa forma, seria interessante associá-los a quimioterápicos em nanoemulsões lipídicas como formulação de aplicação.

1.7. Justificativa

O câncer de mama representa cerca de 28% dos novos casos de câncer a cada ano no Brasil, e os tratamentos, apesar de eficientes, levam à perda de qualidade de vida em função dos efeitos adversos (INCA, 2018; Braybrooke e cols., 2015; Hall e cols., 2014). Isso porque os quimioterápicos tradicionais

agem principalmente nas células durante a divisão celular, induzindo danos no DNA e quebras de cadeia, que interferem no reparo de DNA e na divisão celular. Esses mecanismos podem interferir em qualquer célula, não somente nas células tumorais, causando muitos efeitos adversos que limitam o seu uso e causam dor. A doxorrubicina, principal droga utilizada no tratamento do câncer de mama, é cardiotóxica, nefrotóxica e causa sintomas psiconeurológicos pós-tratamento em pacientes com câncer de mama (Aboalela e cols., 2015). Por outro lado, os produtos naturais com atividade anticancerígena têm ganhado crescente interesse em pesquisas recentes por apresentarem baixa toxicidade às células normais (Zhang e cols., 2014).

Diferentes compostos naturais têm demonstrado efeito modulador na citotoxicidade da doxorrubicina em células de câncer de mama, como por exemplo, a papuamine, o resveratrol e o linalol (Ravizza e cols., 2008; Miyashita e Sadzuka, 2013; Kanno e cols., 2014; Huang e cols., 2014). Neste sentido torna-se interessante verificar o efeito modulador do óleo essencial de *P. gaudichaudianum* frente ao tratamento com doxorrubicina em células tumorais. Além disso, os óleos essenciais podem ser importantes adjuvantes na quimioterapia uma vez que combinados com um quimioterápico podem diminuir a proliferação tumoral, a metástase e a resistência a múltiplas drogas (Gautam, Mantha e Mittal, 2014). Eles também podem ajudar no controle dos efeitos adversos através do efeito analgésico e anti-inflamatório. Considerando que existe um interesse em buscar novas estratégias terapêuticas com uma menor toxicidade às células normais, diminuição dos efeitos adversos e maior especificidade às células tumorais, possibilitando um ganho na qualidade de vida, os óleos essenciais tornam-se uma alternativa interessante.

1.7. Referências Bibliográficas

Aboalela N, Lyon D, Elswick RKJ, Kelly DL, Brumelle J, Bear HD, Jackson-Cook C. Perceived stress levels, chemotherapy, radiation treatment and tumor characteristics are associated with a persistent increased frequency of somatic chromosomal instability in women diagnosed with breast cancer: a one year longitudinal study. *Plos One*.2015;10:E0133380.

Ahmad G, Gattacecca F, Sadda RE, Botchkina G, Ojima I, Egan J, *et al*. Biodistribution and pharmacokinetic evaluation of a novel taxoid DHA-SBT-1214 in oil-in-water nanoemulsion formulation in naive and tumor-bearing mice. *Pharm Res*. 2018;35:91.

Alakhova DY, Kabanov AV. Pluronics and MDR reversal: an update. *Mol Pharm*. 2014;11:2566–2578.

Ambroz M, Bousova I, Skarka A, Hanusova V, Kralova V, Matouskova P, *et al*. The influence of sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules*. 2015;20:15343-15358.

Ambroz M, Matouskova P, Sharka A, Zajdlová M, Zakova K, Skalova L. The effects of selected sesquiterpenes from *Myrica rubra* essential oil on the efficacy of doxorubicin in sensitive and resistant cancer cell lines. *Molecules*. 2017;22(6):1021.

Bakkali F, Averbecka S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxi*. 2008;46:446–475.

Baser KHC, Buchbauer G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. 1st ed. New York: CRC press; 2010.

Bayala B, Bassole IHN, Scifo R, Gnoula C, Morel L, Lobaccaro J-MA, Simpore J. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *Am J Cancer Res*. 2014;4:591-607.

Beller HR, Lee TS, Katz L. Natural products as biofuels and bio-based chemicals: fatty acids and isoprenoids. *Nat Prod Rep*. 2015;32:1508-26.

Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. Anticancer activity of essential oils: a review. *J Sci Food Agric*. 2013;93(15):3643-3653.

Bonassa EMA. Conceitos gerais em quimioterapia antineoplásica. Em: Bonassa EMA, Santana TR. *Enfermagem em terapêutica oncológica*. 1st ed. São paulo: Atheneu, 2005. 3-19 p.

Borges RS, Lima ES, Keita H, Ferreira IM, Fernandes CP, Cruz RAS, *et al.* Anti-inflammatory and analgesic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and molecular docking study of its major chemical constituents. *Inflammopharmacology*. 2018 Feb;26(1):183-195.

Braybrooke JP, Mimoun S, Zarca D, Pinder B, Lloyd AJ, Breheny K, Lomazzi M, Borisch B. Patients' experiences following breast cancer treatment: an exploratory survey of personal and work experiences of breast cancer patients from three european countries. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2015;24:650-61.

Buyel JF. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. *Biotechnol Adv*. 2018 Mar;36(2):506-520.

Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho CRA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev*. 2014, 34(1),106-135.

Chan, W.-K.; Tan, L.T.-H.; Chan, K.-G.; Lee, L.-H.; Goh, B.-H. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. *Molecules*. 2016;21(5):529.

Chen L, Chen B, Deng L, Gao B, Zhang Y, Wu C, Yu N, *et al.* An optimized two-vial formulation lipid nanoemulsion of paclitaxel for targeted delivery to tumor. *Int J Pharm*. 2017 Dec;534(1-2):308-315.

Costa EV, Menezes LRA, Rocha SLA, Baliza IRS, Dias RB, Rocha CAG, *et al.* Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. *Planta Med*. 2015 May;81(7):563-567.

Coté H, Boucher M-A, Pichette A, Legault J. Anti-inflammatory, antioxidant, antibiotic, and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and its constituents. *Medicines*. 2017 May;4(2):E34.

Damia G, Garattini S. The pharmacological point of view of resistance to therapy in tumors. *Cancer Treat Rev*. 2014;40:909-16.

De Carvalho, R.B.F.; De Almeida, A.A.C.; Campelo, N.B.; Lellis, D.R.O.D.; Nunes, L.C.C. Nerolidol and its pharmacological application in treating neurodegenerative diseases: a review. *Recent Pat Biotechnol*. 2018; 12.

De Moraes SM, Facundo VA, Bertini LM, Cavalcanti ESB, Júnior JFA, Ferreira SA, Brito ES, Neto MAS. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from piper species. *Biochem Syst Ecol*. 2007;35:670-675.

Di Pietro A, Dayan G, Conseil G, Steinfels E, Krell T, Trompier D, Baubichon-Cortay H, Jault J. P-glycoprotein-mediated resistance to chemotherapy in cancer cells: using recombinant cytosolic domains to establish structure-function relationships. *Braz J Med Biol Res*. 1999;32:925-939.

Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas medicinais na amazônia e na mata atlântica. 2nd ed. São Paulo: UNESP, 2002.

Feio DCA, de Oliveira NCL, Pereira ELR, Morikawa AT, Muniz JAPC, Montenegro RC, *et al.* Organic effects of associating paclitaxel with a lipid-based nanoparticle system on a nonhuman primate, *Cebus apella*. Int J Nanomedicine. 2017 May;12:3827-3837.

Fernandes Jr, Hézio J. Introdução ao estudo das neoplasias. Em: Baracat FF, Fernandes Jr HJ, Da Silva MJ. Cancerologia atual:um enfoque multidisciplinar. 1st ed. São Paulo: Roca, 2000.

Fidyt, K.; Fiedorowicz, A.; Strzadala, L.; Szumny, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. Cancer Med. 2016;5(10):3007-3017.

Gautam N, Mantha AK, Mittal S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. Biomed Res Int. 2014; 2014.

Govindarajan M, Benelli G. α -Humulene and β -elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 2016 Jul;155(7):2771-2778.

Gupta U, Sharma S, Khan I, Gothwal A, Sharma AK, Singh Y, *et al.* Enhanced apoptotic and anticancer potential of paclitaxel loaded biodegradable nanoparticles based on chitosan. Int J Biol Macromol. 2017 May;98:810-819.

Hall E, Cameron D, Waters R, Barrett-Lee P, Russel S, Bliss JM, Hopwood P. Tact trial investigators. Comparison of patient reported quality of life and impact of treatment side effects experienced with a taxane-containing regimen and standard anthracycline based chemotherapy for early breast cancer: 6 year results from the UK tact trial (cruk/01/001). Eur J Cancer.2014;50:2375-89.

Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2008;8:193-204.

Huang F, Wu XN, Chen J, Wang WX, Lu ZF. Resveratrol reverses multidrug resistance in human breast cancer doxorubicin-resistant cells. Exp Ther Med. 2014;7:1611-1616.

Huber PC, Maruiama CH, Almeida WP. Glicoproteína-p, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. Quim Nova. 2010; 33:2148-2154.

Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer: Mama. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acessado em: 22 de fevereiro de 2018.

Instituto Oncoguia. Tratamentos. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/>. Acessado em 10 de abril de 2018.

Jiang SP, He SN, Li YL, Feng DL, Du YZ, Yu HY, *et al.* Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3141-50.

Kanno SI, Yomogida S, Tomizawa A, Yamazaki H, Ukai K, Mangindaan RE, Namikoshi M, Ishikawa M. Combined effect of papuamine and doxorubicin in human breast cancer mcf-7 cells. *Oncol Lett*. 2014;8:547-550.

Ko Y-J, Ahn G, Ham Y-M, Song S-M, Ko E-Y, Cho S-H, *et al.* Anti-inflammatory effect and mechanism of action of *Lindera erythrocarpal* essential oil in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Excli J*. 2017 Aug;16:1103-1113.

Lao J, Madani J, Puértolas T, Alvarez M, Hernández A, Pazo-Cid R, *et al.* Liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. *J Drug Deliv*. 2013;2013:456409.

Legault J, Pichette A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J Pharm Pharmacol*. 2007, 59,1643–1647.

Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Res*. 2007;27(5A):3293-3299.

Manini PR. Efeito do óleo essencial de *piper gaudichaudianum* kunth e compostos majoritários em linhagens tumorais [dissertação]. [Porto Alegre]: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2015. 85 p.

Mills GB, Rieger PT. Predisposição genética ao câncer. Em: União Internacional contra o câncer. UICC manual de oncologia clínica. 8 ed. São paulo: Wiley, 2006.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56:185-229.

Miyashita M, Sadzuka Y. Effect of linalool as a component of *humulus lupulus* on doxorubicin-induced antitumor activity. *Food Chem Toxicol*. 2014;53:179-179.

Morandim-Giannetti AA, Pin RAR, Pietro NAS, Oliveira HC, Mendes-Giannini MJS, Lecio AC, *et al.* Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*

of essential oils from leaves of piper and peperomia species. Journal of medicinal plants research. 2010;4:1810-1814.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. J Nat Prod. 2016;79(3):629-661.

Noorizadeh H, Farmany A, Noorizadeh M. Quantitative structure–retention relationships analysis of retention index of essential oils. Quim Nova. 2011;34:242-249.

Patel KJ, Trédan O, Tannock IF. Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. Cancer Chemother Pharmacol. 2013 Jul;72:127-138.

Péres VF, Moura DJ, Sperotto ARM, Damasceno, FC, Caramão EB, Zini CA, Saffi J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* kunth leaves. Food Chem Toxicol, 2009;47:2389-2395.

Periasamy VS, Athinarayanan J, Alshatwi AA. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa* L. essential oil on breast cancer cells. Ultrason Sonochem. 2016 Jul;31:449-55.

Poddighe, L.; Carta, G.; Serra, M.P.; Melis, T.; Boi, M.; Lisai, S.; Muru, E.; Muredda, L.; Banni, S.; Quartu, M. Acute administration of beta-caryophyllene prevents endocannabinoid system activation during transient common carotid artery occlusion and reperfusion. Lipids Health Dis. 2018; 17:23.

Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. Chem Biol. 2010;17:421-433.

Rahman M, Hasan MR. Cancer metabolism and drug resistance. Metabolites. 2015;5: 571-600.

Ramos F. Investigação do mecanismo de citotoxicidade do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth em células V79 [dissertação]. [Porto Alegre]: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; 2015. 119 p.

Ravizza R, Gariboldi MB, Molteni R, Monti E. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. Oncology Reports. 2008;20:625-630.

Russo R, Corasaniti MT, Bagetta G, Morrone LA. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. Evid Complement Alternat Med. 2015;2015:397821.

Seca AML, Pinto DCGA. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan;19(1):E263.

Silva EMJ, Machado SR. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (miq.) C. Dc. Var. *Regnellii* (piperaceae). *Rev Bras Bot*. 1999;22:117- 124.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al*. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19): 10869-10874.

Speechley V, Rosenfield M, Judd S. Tudo sobre câncer. 1st ed. São Paulo: Andrei, 2000.

Sperotto ARM, Moura DJ, Péres VF, Damasceno FC, Caramão EB, Henriques JAP. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food Chem Toxicol*. 2013;57:57-68.

Thirugnanasampandan R, David D. In vitro antioxidant and cytotoxic activities of essential oil of *Feronia elephantum* correa. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2014;4:290-293.

Valdés K, Morales J, Rodríguez L, Günther G. Potential use of nanocarriers with pentacyclic triterpenes in cancer treatments. *Nanomedicine (Lond)*. 2016 Dec;11(23):3139-3156.

Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:938-45.

Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Bioch Biophys Acta*. 2014 Jan;1845(1):84-89.

Yoshida M, Shiojima I, Ikeda H, Komuro I. Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-atm-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of rac1 activity. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47:698-705.

Wilcken, N.; Dear, R. Chemotherapy in metastatic breast cancer: a summary of all randomized trials reported 2000-2007. *Eur J Cancer*. 2008;44(15):2218-2225.

Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009;57:435-445.

Zembutsu H. Pharmacogenomics toward personalized tamoxifen therapy for breast cancer. *Pharmacogenomics*. 2015;16(3):287-296.

2. Objetivos

Avaliar o efeito modulador do óleo essencial da *Piper gaudichaudianum* na citotoxicidade da doxorrubicina em células MCF7, atendendo os seguintes objetivos específicos:

- a) Confirmar a composição do óleo essencial conforme descrito na literatura, assim como determinar a concentração destes componentes no óleo, através da comparação com padrões em análise por GC-MS.
- b) Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial em células MCF7 (adenocarcinoma mamário humano), após 96 horas de tratamento, através do ensaio com corante azul de trypan.
- c) Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial em H9C2 (cardiomiócito embrionário de rato) após 96 horas de tratamento, através do ensaio com corante azul de trypan e identificar o perfil de morte pela utilização de marcadores fluorescentes anexina-FITC (apoptose) e PI (necrose).
- d) Avaliar o efeito da combinação do óleo essencial com doxorrubicina em tratamento de 96 horas, em célula MCF7, medindo a viabilidade por azul de trypan.

- e) Avaliar o efeito do óleo essencial no acúmulo intracelular de doxorubicina em células MCF7, após 6 horas de tratamento, medindo a autofluorescência da doxorubicina por citometria de fluxo.
- f) Avaliar a geração da espécie reativa ânion superóxido em células MCF7 tratadas por 16 horas com o óleo essencial, através da medição da fluorescência do mitosox oxidado na presença desse ânion.
- g) Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial, através da capacidade de sequestrar elétrons do radical DPPH em tubo de ensaio, medindo a absorbância da reação em espectrofotômetro.

3. Artigo científico

**Antioxidant and Antitumoral Activities of *Piper gaudichaudianum*
Essential Oil and Its Modulating Effect on Doxorubicin Cytotoxicity.**

Paula Pellenz Tomasini, Tiago Franco de Oliveira, Luana da Silva Aguiar,
Dinara Jaqueline Moura

Será enviado para publicação na Revista "Anticancer Agents in Medicinal
Chemistry"

Title: Antioxidant and Antitumoral Activities of *Piper gaudichaudianum* Essential Oil and Its Modulating Effect on Doxorubicin Cytotoxicity.

Paula Pellenz Tomasini^a, Tiago Franco de Oliveira^b, Luana da Silva Aguiar^a, Dinara Jaqueline Moura^{*c}

^aToxicology Genetics Laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; ^b Department of Pharmaceuticals, Analytical Center, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; ^c Department of Pharmaceuticals, Toxicology Genetics Laboratory, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

*Address correspondence to this author at Toxicology Genetic Laboratory, Building 3, Level 7, Room 714, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, RS, Brazil, 90050-170, Tel: +55 (51) 3303-8861. E-mail: dinaram@ufcspa.edu.br

Abstract: Conventional cancer treatments can cause side effects. Doxorubicin is a chemotherapy widely used to treat breast cancer, but its use is limited by the cardiotoxic effect. The search for new therapies that improve the effectiveness of treatment reducing these side effects becomes necessary. The *Piper gaudichaudianum* Kunth is a medicinal plant from a highly studied family Piperaceae and its essential oil is composed of sesquiterpenes with promising antitumor, analgesic and anti-inflammatory activity. This work aims to identify medicinal properties to *P. gaudichaudianum* essential oil when combined with doxorubicin in MCF7 breast cancer line. The composition of the essential oil was analyzed by GC-MS and showed that the essential oil is composed mainly of (E)-nerolidol, (E)-caryophyllene and α -humulene. The oil also showed to have free radical scavenging activity by the DPPH assay as well as antitumor activity in MCF7 breast cancer cell line by the trypan blue assay, without cytotoxicity to H9C2 non-tumor cell line. The essential oil of *P. gaudichaudianum* modulated the doxorubicin-induced cytotoxicity in MCF7 cells after 96 hours of treatment. Interestingly, it did not increase the generation of superoxide in the tumor cell line after 16 hours of treatment, but it showed an increased accumulation of intracellular chemotherapy when evaluated after 6 hours of treatment. The essential oil of *P. gaudichaudianum* appears to be a good adjuvant candidate in doxorubicin chemotherapy.

Keywords: Essential oil, medicinal plant, antitumor, antioxidant, doxorubicin, breast cancer, cardiomyocyte, adjuvant.

1. INTRODUCTION

Piper gaudichaudianum Kunth (Piperaceae) is a medicinal plant found in Atlantic Forest. The leaves are used by local population to relieve toothache and the roots are chewed to relieve liver disorders [1]. In earlier studies the essential oil of *P. gaudichaudianum* showed be mainly composed of sesquiterpenes with promising medicinal activity: (E)-nerolidol, α -humulene and (E)-caryophyllene [2,3].

The essential oil of plants containing (E)-nerolidol presents antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*, showing a neuroprotective effect against damage by reactive species, besides anticholinesterase and antinociceptive effect [4,5,6]. The sesquiterpene (E)-caryophyllene is known as a cannabinoid receptor agonist 2 (CB2), with *in vivo* analgesic effect and anti-inflammatory activity besides *in vitro* antitumor property [7,8]. (E)-caryophyllene is also capable of enhancing the cytotoxicity of some chemotherapeutic agents, such as paclitaxel, and sesquiterpene α -humulene in MCF7 cells [9]. (E)-nerolidol and α -humulene sesquiterpenes also demonstrated proprieties of oncologic interest once they showed increase intracellular accumulation of the chemotherapeutic doxorubicin in Caco-2 cells [10].

Doxorubicin is an anthracycline antibiotic with antitumor activity, it is widely used to treat breast cancer, with effectiveness to both initial stages and metastasis. Therefore, this chemotherapeutic drug has high toxicity, mainly cardiotoxic, and this adverse effect can be fatal, which limits its use [11,12,13]. Therefore, there is a need to find therapeutic alternatives that offer lower collateral toxicity than currently used chemotherapeutic agents or that act as adjuvants, reinforcing therapeutic approach and decreasing adverse effects [14].

The essential oils may be important adjuvants in chemotherapy since when combined with a chemotherapeutic they can decrease tumor proliferation, metastasis and resistance to multiple drugs [15]. They could also help in controlling the adverse effects through the analgesic and anti-inflammatory effect, allowing a gain in quality of life. Thus, the aim of this work was evaluating the effect of *P. gaudichaudianum* essential oil in the modulation of cytotoxicity induced by doxorubicin in breast cancer cell line MCF7. Since the doxorubicin showed cardiotoxicity the *P. gaudichaudianum* essential oil effect was also evaluated in a heart cell line H9C2.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), RPMI-1640 medium, fetal bovine serum (FBS), 0.25% trypsin-EDTA (1X), penicillin/streptomycin, fungizone and phosphatase buffered saline (PBS) were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 and rat embryonic cardiomyocyte cell line H9C2 were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). MycoAlert mycoplasma detection kit was purchased from Lonza (Basel, Switzerland). Trypan blue, hydrogen peroxide (H₂O₂), doxorubicin hydrochloride, nerolidol (mixture of cis and trans), (-)-trans-caryophyllene, α -humulene, dimethyl sulfoxide (DMSO), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ($\pm$)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). FITC Annexin V/dead cell apoptosis kit and mitoSOX red indicator were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). All other reagents were analytical grade.

2.2. Sample

The leaves of *P. gaudichaudianum* were collected in July 2017 in Riozinho (Rio Grande do Sul, Brazil). The leaves were air-dried in shade and a voucher specimen is deposited at Herbarium of the Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (No.: ICN 128412). The leaves (36 g) were hydrodistilled for 4 h in a Clevenger type apparatus according to British Pharmacopoeia Commission (2013), producing 0.5% (w/v) of essential oil. The yellow color essential oil was stored in a closed dark vial at -10°C and it was stored for no more than one month until use in cell culture.

2.3. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

The major constituents of *Piper gaudichaudianum* essential oil (EO) were analyzed by GC-MS. The samples of essential oil were diluted (1:1000 and 1:200 v/v) in hexane prior to GC-MS analysis. A Shimadzu GC/MS (model QP2010 Ultra) was employed using electron ionization equipped with an injector (model AOC-20i) and with a RESTEK RTX5-MS column (30m x 0.25mm x 0.25 μ m). It was injected 0.5 μ L on the analytic system under the following conditions, temperature program: 80°C (2 min), 12°C/min to 150°C (2min), raising to 6°C/min until 250°C (1 min), total time running of 27 min and 50 secs, injector temperature: 200°C, split ratio: 1:15, carrier gas: helium (flow rate: 1.64 mL/min). The ionization font was at 200°C, full scan mode (m/z 50 to m/z 350), 70 eV. The following ions was selected to identification of the major constituents, (E)-caryophyllene: m/z 133, m/z 93, m/z 69, α -humulene: m/z 121, m/z 93, m/z 80, (E)-nerolidol: m/z 107, m/z 93, m/z 69. A calibration curve was performed at following concentrations rates, (E)-caryophyllene: 0.5 – 0.1 mg/mL, α -humulene: 1.2 – 0.4 mg/mL, nerolidol (cis and trans mixture): 6.8 – 2.28 mg/mL. Data were processed using lab solutions software. Essential oil compounds were identified by the NIST standard reference database or with mass spectra from the literature [2]. All determinations were performed in triplicated.

2.4. Cell culture and treatments

Human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 and rat embryonic cardiomyocyte cell line H9C2 were cultured under standard conditions in RPMI-1640 supplemented with 20% heat-inactivated FBS and DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, respectively, both supplemented with 0.2 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Cells were maintained in tissue-culture flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The EO dissolved in ethanol, was added to culture medium to achieve different designed concentrations (10, 20, 40 and 80 μ g/mL). The final ethanol concentration in the medium never exceeded 0.16%, and a negative control was exposed to the higher concentration of solvent. Cells were seeded in FBS supplemented medium and grown for one day before receive treatment with the essential oil and doxorubicin (0.12 μ M). The cells were treated for 6, 16 or 96 hours under standard conditions. After treatment, the survival was accessed by trypan blue, the superoxide production was analyzed by mitoSOX fluorescence and the cell intake of doxorubicin was accessed by auto fluorescence. Annexin V-FITC and PI were used to analyze cell death.

2.5. Trypan blue exclusion assay (TB)

Cell viability was measured by TB exclusion assay. After treatment cells are washed with PBS, detached using trypsin, resuspended in PBS, stained with trypan blue and counted using Countess

automated cell counter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). The viability was calculated as a relative percentage of negative control.

2.6. Analysis of cell death by FITC annexin V/dead cell apoptosis kit

A FITC annexin V/dead cell apoptosis kit was used to determine apoptotic and necrotic cells. After treatment, cells were trypsinized, collected and resuspended in 40 μ L of binding buffer with 2 μ L Annexin V-FITC. Cells were incubated for 15 min in the dark at room temperature. After incubation, 160 μ L of binding buffer and 2 μ L of PI were added. Cells were incubated for 5 min and additional 200 μ L of binding buffer were added. Data were collected and analyzed in a FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) flow cytometer with CellQuest software, in a total of 20,000 events per sample; fluorescence was measured, and the percentage of viable, early apoptotic, late apoptotic and necrotic cells was determined.

2.7. Intracellular Doxorubicin accumulation

The Doxorubicin auto fluorescence was evaluated after cell treatment with doxorubicin in combination with *P. gaudichaudianum* essential oil (EO). Cells were washed with PBS after treatment, detached with trypsin, resuspended in PBS and the fluorescence was measured in FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), using the following parameters: 488 nm excitation and 585 nm emission. A total of 10,000 cells were counted in each experiment. The Cell Quest software (Becton Dickinson) was used to calculate the median fluorescence.

2.8. MitoSOX red assay for the determination of superoxide production

Levels of mitochondrial superoxide were estimated using the fluorogenic dye mitoSOX. After treatment cells were washed and incubated with mitoSOX for 10 min at 37 °C in the dark. After incubation, cells were washed with PBS and analyzed using FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The mitoSOX oxidation was measured using 488 nm excitation and 580 nm emission filter. A total of 10,000 cells were counted in each experiment. The Cell Quest software (Becton Dickinson) was used to calculate the median fluorescence. Data were expressed as percentages of control values.

2.9. Free radical scavenging activity assay

The free radical scavenging activity of *P. gaudichaudianum* essential oil was measured according to method described by Blois [16] with some adaptations. The sample was diluted in ethanol (100, 80, 60, 40 and 20 mg/mL) for radical scavenging activity test. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 500 mM was prepared in methanol and 500 μ L of this solution was added to 400 μ L of TRIS-HCl solution (100 mM, pH 7.4) and 100 μ L of sample. The reagent solutions were incubated at room temperature for 30 min, then a dilution in ethanol (1:3 v/v) was prepared in a 96 well plate before measure absorbance at 517 nm using a SpectraMax M2e microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) spectrophotometer. A reference compound (0.2 mg/l trolox solution in ethanol) was used as test control. The experiments were repeated three times. The percentage of radical scavenging (RSA%) was calculated using the following equation:

$$\text{RSA\%} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

In which A0 is the absorbance of the control reaction (without essential oil), and A1 is the absorbance in the presence of sample. The inhibitory concentration that reduces 50% of free radicals (IC₅₀) was calculated by linear regression graphic.

2.11. Statistical analysis

All experiments were independently repeated at least two times. Results are expressed as means $\pm$ standard deviation (SD). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and means were compared using the Dunnetts test, with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In the first step it was evaluated the chemical composition of *P. gaudichaudianum* essential oil. As showed before, (E)-nerolidol, (E)-caryophyllene and alfa-humulene are the major constituents [2,3]. In this work the concentration of these majors *P. gaudichaudianum* essential oil constituents were

established by GC-MS. Table 1 shows the calculated concentration of each constituent and the chromatographic profile is showed at Figure 1, as well as the retention times. After the EO composition be confirmed we performed the next experiments in order to evaluate the antitumor properties of EO and its modulatory effect on doxorubicin cytotoxicity.

The cytotoxic potential of the EO was evaluated by the trypan blue assay in human tumor cell line. *P. gaudichaudianum* essential oil induced concentration-dependent cytotoxic effects after 96 hours of treatment in MCF7 breast cancer cells (Figure 2) especially at high concentrations, which EO induced significative cytotoxicity. The IC_{50} value after 96 hours of treatment of *P. gaudichaudianum* essential oil in MCF7 was 65.67 $\mu\text{g/mL}$. Since the concentration of 80 $\mu\text{g/mL}$ showed a high cytotoxicity, we choose to follow further experiments with the concentrations of 10, 20 and 40 $\mu\text{g/mL}$.

Once the EO presented antitumor activity, an assay was carried out to analyze whether it would have the ability to modulate the cytotoxicity of the doxorubicin. The *P. gaudichaudianum* essential oil appears to modulate the cytotoxicity of doxorubicin in MCF7 cells as showed in Figure 3 by decreasing the cell viability after 96 hours of treatment, inducing a significant decrease at concentrations of 20 and 40 $\mu\text{g/mL}$.

Interestingly, when we evaluate the cytotoxicity of EO in cardiomyocytes H9C2, no significant decrease in cell viability can be observed after 96 hours of treatment (Figure 4). While doxorubicin treatment induces a significant decreased in H9C2 cells viability. To confirm this absence of cytotoxicity we evaluated the cell labeling with annexin V-FITC and PI after these same treatment conditions and the results confirm that EO doesn't induce an increase in cell death in H9C2 cell (Figure 5), differing from doxorubicin.

To investigate the mechanism by which the EO increases the toxicity of doxorubicin, we evaluated the intracellular accumulation of doxorubicin by measuring the fluorescence of the drug, and the results showed that the *P. gaudichaudianum* EO induces a significant increase accumulation of intracellular doxorubicin (Figure 6).

The improvement in doxorubicin cytotoxicity induced by *P. gaudichaudianum* EO can be associated to the doxorubicin intracellular accumulation increase. The (E)-nerolidol and (E)-caryophyllene can increase penetration across the plasma membrane [4,17], being able to be responsible for this effect in EO. This enhancer in doxorubicin intracellular intake makes the EO a suitable candidate as adjuvant in chemotherapy, since it has also been shown to be non-cytotoxic to the heart cell line, which is the main target organ of the adverse effects of this chemotherapy drug treatment, due to reactive oxygen species (ROS) increase [18,19,20].

The ability of EO to induce ROS formation was evaluated in MCF7 cells to investigate if it is a mechanism of cytotoxicity induction. The results showed that the essential oil does not increase the production of superoxide anion, indicating that it does not alter the redox state of the cells (Figure 7). On the other hand, when we evaluated the antioxidant action of EO we observed a concentration-dependent effect in scavenging the free radical DPPH (Figure 8), indicating an antioxidant effect ($IC_{50} = 69.7 \text{ mg/mL}$).

As showed in this work and others from our group (E)-nerolidol is the more abundant constituent in *P. gaudichaudianum* essential oil [2,3]. The (E)-nerolidol is an antioxidant compound [4], which may be responsible for the pharmacological actions of essential oil. The antioxidant activity of the EO could be helpful to control the adverse effects of doxorubicin, since this drug causes oxidative damages, which include increased levels of oxygen and nitrogen reactive species and lipid peroxidation in healthy cells [21,22]. Also, it is important to note that the EO showed antitumor activity without elevating superoxide anion generation. This is relevant since some essential oils, although antioxidants, can be intracellular pro-oxidants and consequently cause mitochondrial membrane damage [23,24,25], which does not appear to occur in MCF7 cells.

4. CONCLUSION

The *Piper gaudichaudianum* essential oil showed to be a good source of sesquiterpenes with related analgesic activities, (E)-nerolidol and (E)-caryophyllene besides having antioxidant activity. These properties could be helpful for controlling of chemotherapy adverse effects. Furthermore, the EO showed improve the intracellular intake of doxorubicin and cytotoxicity for breast cancer cell line MCF7, having antitumoral activity without being toxic for non-tumor H9C2 cell line.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no competing interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS (no. 16/2551-0000473-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES and Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq.

REFERENCES

- [1] Di Stasi, L.C.; Hiruma-Lima, C.A. *Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2nd ed.; Unesp: São Paulo, **2002**.
- [2] Péres, V.F.; Moura, D.J.; Sperotto, A.R.M.; Damasceno, F.C.; Caramão, E.B.; Zini, C.A.; Saffi, J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. *Food Chem. Toxicol.*, **2009**, *47*, 2389-2395.
- [3] Sperotto, A.R.M.; Moura, D.J.; Péres, V.F.; Damasceno, F.C.; Caramão, E.B.; Henriques, J.A.P. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, *57*, 57-68.
- [4] Chan, W.-K.; Tan, L.T.-H.; Chan, K.-G.; Lee, L.-H.; Goh, B.-H. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. *Molecules* **2016**, *21*(5), 529.
- [5] Fonsêca, D. V.; Salgado, P. R. R.; de Carvalho, F. L.; Salvadori, M. G. S. S.; Penha, A. R. S.; Leite, F. C.; Borges, C. J. S.; Piuvezam, M. R.; Pordeus, L. C. d. M.; Sousa, D. P.; Almeida, R. N. Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **2016**, *30*(1), 14-22.
- [6] De Carvalho, R.B.F.; De Almeida, A.A.C.; Campelo, N.B.; Lellis, D.R.O.D.; Nunes, L.C.C. Nerolidol and its pharmacological application in treating neurodegenerative diseases: a review. *Recent. Pat. Biotechnol.*, **2018**, *12*.
- [7] Fidy, K.; Fiedorowicz, A.; Strzadala, L.; Szumny, A. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Med.*, **2016**, *5*(10), 3007-3017.
- [8] Poddighe, L.; Carta, G.; Serra, M.P.; Melis, T.; Boi, M.; Lisai, S.; Muru, E.; Muredda, L.; Banni, S.; Quartu, M. Acute administration of beta-caryophyllene prevents endocannabinoid system activation during transient common carotid artery occlusion and reperfusion. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 23.
- [9] Legault, J.; Pichette, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2007**, *59*, 1643-1647.
- [10] Ambroz, M.; Bousova, I.; Skarka, A.; Hanusova, V.; Kralova, V.; Matouskova, P.; Szotakova, B.; Skalova, L. The influence of sesquiterpenes from *Myricarubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules*, **2015**, *20*, 15343-15358.
- [11] Wilcken, N.; Dear, R. Chemotherapy in metastatic breast cancer: a summary of all randomized trials reported 2000-2007. *Eur. J. Cancer*, **2008**, *44*(15), 2218-2225.
- [12] Carvalho, F.S.; Burgeiro, A.; Garcia, R.; Moreno, A.J.; Carvalho, R.A.; Oliveira, P.J. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med. Res. Rev.*, **2014**, *34*(1), 106-135.
- [13] Lao, J.; Madani, J.; Puértolas, T.; Alvarez, M.; Hernández, A.; Pazo-Cid, R.; Artal, A.; Torres, A.A. Liposomal Doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. *J. Drug. Deliv.*, **2013**, *2013*, 456409.
- [14] Bhalla, Y.; Gupta, V.K.; Jaitak, V. Anticancer activity of essential oils: a review. *J. Sci. Food Agric.*, **2013**, *93*(15), 3643-3653.
- [15] Gautam, N.; Mantha, A.K.; Mittal, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, *2014*, 154106.
- [16] Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **1958**, *26*, 1199-1200.
- [17] Di Giacomo, S.; Di Sotto, A.; Mazzanti, G.; Wink, M. Chemosensitizing Properties of β -Caryophyllene and β -Caryophyllene Oxide in Combination with Doxorubicin in Human Cancer Cells. *Anticancer Res.*, **2017**, *37*, 1191-1196.
- [18] Shaker, R.A.; Abboud, S.D.; Assad, H.C.; Hadi, N. Enoxaparin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *BMC Pharmacol. Toxicol.*, **2018**, *19*, 3.
- [19] Tang, F.; Zhou, X.; Wang, L.; Shan, L.; Li, C.; Zhou, H.; Lee, S.M.; Hoi, M.P. A novel compound DT-010 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in zebrafish and H9c2 cells by inhibiting reactive oxygen species-mediated apoptotic and autophagic pathways. *Eur. J. Pharmacol.*, **2018**, *820*, 86-96.
- [20] Hegedüs, C.; Kovács, K.; Polgár, Z.; Regdon, Z.; Szabó, E.; Robaszekiewicz, A.; Forman, H.J.; Martner, A.; Virág, L. Redox control of cancer cell destruction. *Redox Biol.*, **2018**, *16*, 59-74.
- [21] Hajra, S.; Patra, A.R.; Basu, A.; Bhattacharya, S. Prevention of doxorubicin (DOX)-induced genotoxicity and cardiotoxicity: Effect of plant derived small molecule indole-3-carbinol (I3C) on oxidative stress and inflammation. *Biomed. Pharmacother.*, **2018**, *101*, 228-243.
- [22] Panchuk, R.; Skorokhlyd, N.; Chumak, V.; Lehka, L.; Omelyanchik, S.; Gurinovich, V.; Moiseenok, A.; Heffeter, P.; Berger, W.; Stoika, R. Specific antioxidant compounds differentially modulate cytotoxic activity of doxorubicin and cisplatin: in vitro and in vivo study. *Croat Med. J.*, **2014**, *55*(3), 206-217.
- [23] Bayala, B.; Bassole, I.H.N.; Scifo, R.; Gnoula, C.; Morel, L.; Lobaccaro, J.-M. A.; Simpore, J. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *Am. J. Cancer Res.*, **2014**, *4*, 591-607.
- [24] Gautam, N.; Mantha, A.K.; Mittal, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, *2014*, 154106.
- [25] Russo, R.; Corasaniti, M.T.; Bagetta, G.; Morrone, L.A. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2015**, *2015*, 397821.

Table 1. Concentration of the major constituents of *P. gaudichaudianum* essential oil. Data represents the mean of triplicate experiments analyzed by GC-MS.

Compounds	Range of calibrated curve (mg/mL)	Coefficient correlation R^2	Concentration mg/mL of EO
(E)-nerolidol	2.28 - 6.8	0.9943	166.4
(E)-caryophyllene	0.1 - 0.5	0.9948	73.7
α -humulene	0.4 - 1.2	0.9925	44.2

Figure 1. EO cromathografic perfil. Total ion chromatogram (TIC) of the major constituents of *P. gaudichaudianum* essential oil: (E)-caryophyllene (RT; 9.271 min), α -humulene (RT; 9.844 min) and (E)-nerolidol (RT; 11.668 min).

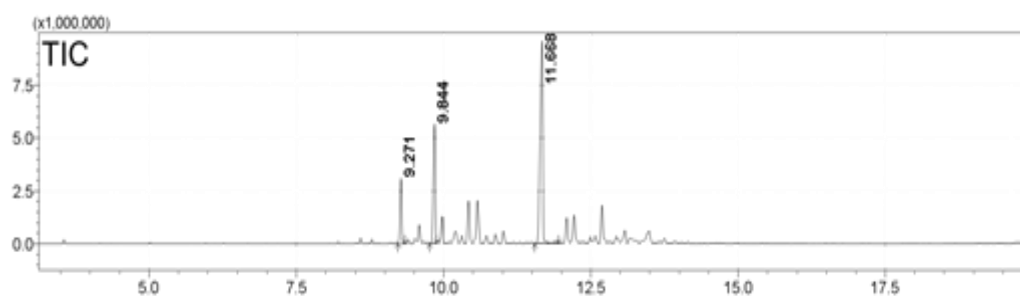


Figure 2. Cytotoxicity of *P. gaudichaudianum* essential oil (EO) in MCF7 cells after 96 hours of treatment evaluated by trypan blue assay. Data represent mean $\pm$ standard derivation of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significant difference to untreated negative control (NC).

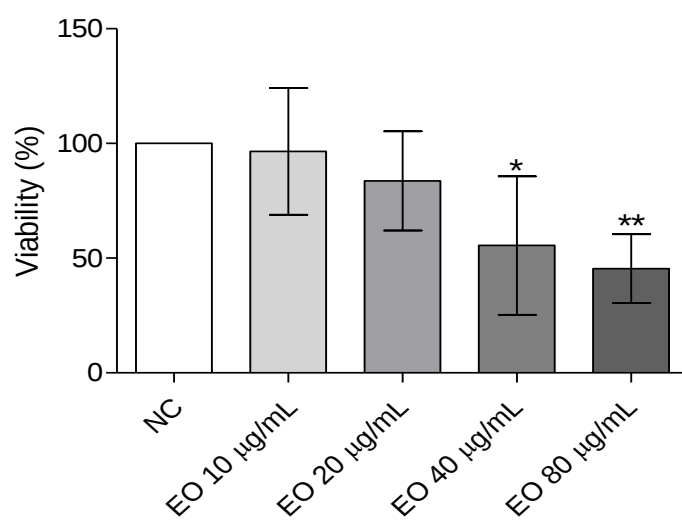


Figure 3. Cytotoxicity of different concentrations of *P. gaudichaudianum* EO in combination with 0.12 μ M of doxorubicin after 96 h of treatment in MCF7 cell evaluated by trypan blue assay. Viability as percentage of negative control (untreated). Data represent mean $\pm$ standard derivation of three independent experiments. * $p < 0.05$ significant difference to doxorubicin (DOX).

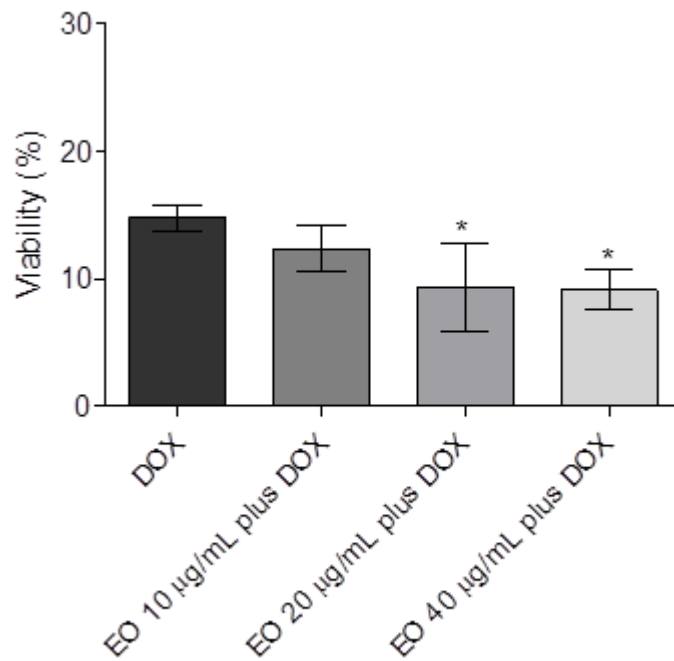


Figure 4. *P. gaudichaudianum* EO cytotoxicity in H9C2 cell after 96 h of treatment evaluated by trypan blue assay. Doxorubicin (DOX, 0.12 μ M) was used as positive control. Viability as percentage of NC (untreated). Data represent mean $\pm$ standard derivation of three independent experiments. *** $p < 0.001$ significant difference to negative control (NC).

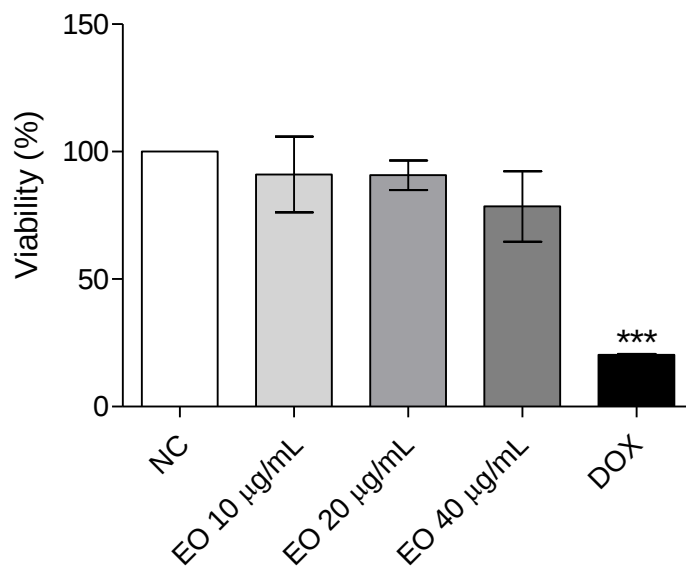


Figure 5. Dead cell profile of *P. gaudichaudianum* EO treatment in H9C2 cell. 0.12 μ M doxorubicin (DOX) was used as positive control. Cells were treated for 96 h until the analysis. Data represent mean $\pm$ standard derivation of two independent experiments.

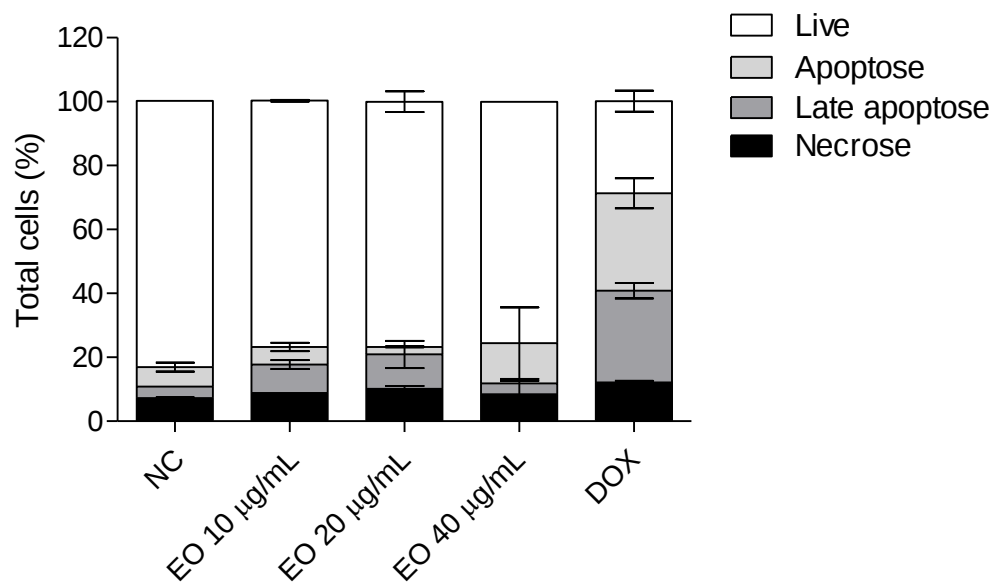


Figure 6. Intracellular intake of doxorubicin in presence of *P. gaudichaudianum* EO. MCF7 cells was treated with 0.12 μ M doxorubicin (DOX) plus different increase concentrations of EO for 6 h. Data represent median fluorescence intracellular as percentage of doxorubicin (DOX) and standard derivation of three independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ significant difference of control (DOX).

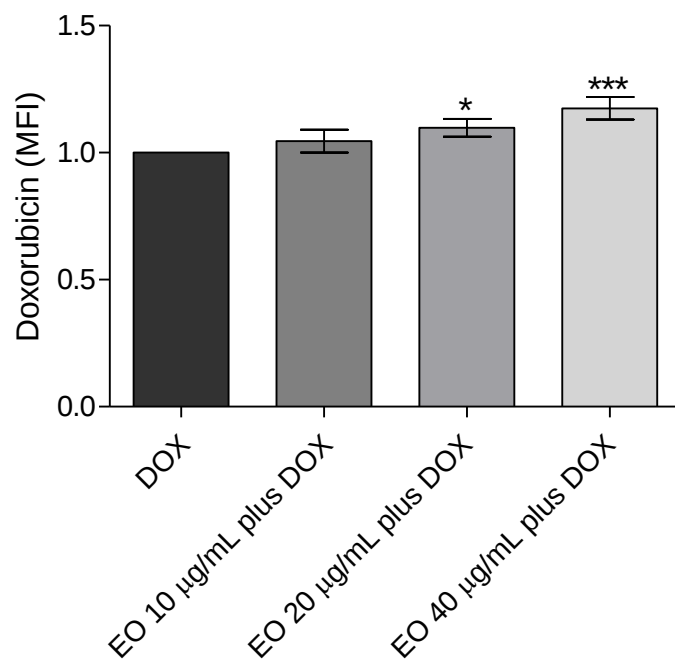


Figure 7. Median fluorescence intracellular of mitosox oxidation in presence of superoxide. MCF7 cells treated with *P. gaudichaudianum* EO for 16 h showed no increase in superoxide. 2 mM of hydrogen peroxide (1 h of treatment) was used as positive control of the test. Data represent mean and standard derivation of three independent experiments. *** $p < 0.001$ significant difference of untreated negative control (NC).

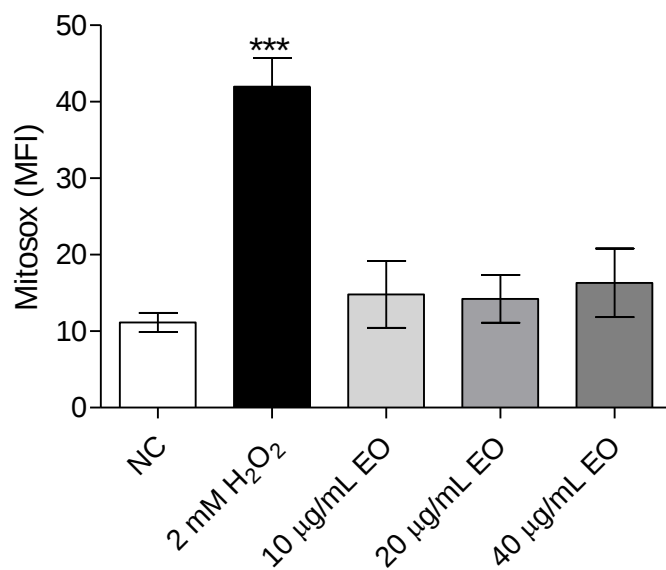
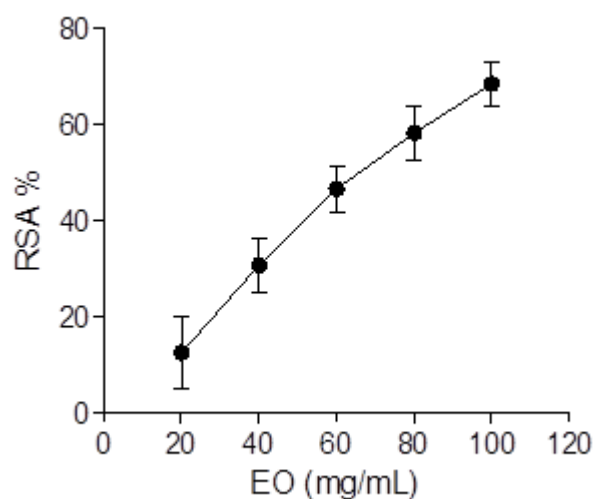


Figure 8. DPPH scavenging activity of *P. gaudichaudianum* EO at increase concentrations. Data represent mean $\pm$ standard derivation of three independent experiments. A linear regression showed IC₅₀ of 69.7 mg/mL. Reactive scavenging activity (RSA) as percentage of control (without EO).



4. Considerações finais e perspectivas

O presente estudo faz parte do projeto intitulado “Análise do mecanismo de ação do óleo essencial da *Piper gaudichaudianum* na citotoxicidade da doxorubicina” e está registrado na Comissão de Pesquisa da UFCSPA sob número 081/2015.

O estudo do óleo essencial da *Piper gaudichaudianum* Kunth iniciou no grupo de pesquisa em 2005 e desde então vem gerando dados interessantes. A planta despertou interesse por ser usada popularmente como analgésica e anti-inflamatória, porém não existiam estudos de citotoxicidade que garantissem sua segurança. O grupo iniciou então os estudos toxicológicos do óleo *in vitro* e sua citotoxicidade aguda em células V79 e em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* despertou atenção, gerando dois artigos publicados. Visto que o óleo apresentava interessante toxicidade, foram iniciados os estudos em células tumorais e o óleo mostrou mais uma vez ser citotóxico.

No estudo apresentado nessa dissertação, o óleo essencial da *Piper gaudichaudianum* mostrou ser uma boa fonte de sesquiterpenos, com efeito antitumoral seletivo, pois não mostrou citotoxicidade na linhagem não tumoral de cardiomiócito. Ao aprofundar o estudo da atividade antitumoral, na linhagem de câncer de mama, foi visto que o óleo não aumentou a geração de superóxido mitocondrial em 16 horas de tratamento, porém outros tempos de tratamento precisam ser testados e outras espécies reativas podem ser avaliadas para confirmar esse resultado negativo e, caso o resultado se confirme, um ensaio avaliando a atividade antioxidante intracelular poderia ser acrescentado, pois o óleo já mostrou ter atividade antioxidante isoladamente,

isto é, na ausência contato com células. Devido à característica lipofílica do óleo, seria importante investigar a despolarização de membrana mitocondrial como um possível mecanismo de ação, pois ele pode danificar as membranas celulares.

Ao avaliar a combinação do óleo essencial com o quimioterápico doxorrubicina em célula tumoral foi visto um aumento na citotoxicidade, possivelmente por um sinergismo das drogas. Investigando essa interação, foi visto que o óleo aumentou o acúmulo intracelular do quimioterápico nessas células. Seria importante testar se esse aumento de citotoxicidade também ocorre na linhagem não tumoral, com aumento de acúmulo de doxorrubicina intracelular, ou se o tratamento combinado apresenta seletividade para a célula tumoral. Também seria interessante investigar aumento ou diminuição de geração de espécie reativas e a despolarização de membrana mitocondrial na linhagem tumoral tratada com ambas as drogas para aprofundar a investigação do sinergismo entre as drogas. Por fim, uma nanoemulsão do óleo com a doxorrubicina poderia ser formulada para avaliação de citotoxicidade *in vitro*, pois o óleo mostrou aumentar o acúmulo de doxorrubicina na célula tumoral e uma nanoemulsão poderia auxiliar nesse processo de entrega de doxorrubicina para a célula, viabilizando também a ação conjunta dessas duas drogas em um teste *in vivo*.

O óleo essencial da *P. gaudichaudianum* é constituído principalmente pelos sesquiterpenos (E)-nerolidol e (E)-cariofileno, que têm atividade analgésica e anti-inflamatória mostrados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Seria interessante como próximo passo testar se o óleo também possui essas propriedades *in vivo*.

5. Anexo

Normas do manuscrito para submissão na revista *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*:

MANUSCRIPT PREPARATION

The manuscript should be written in English in a clear, direct and active style. All pages must be numbered sequentially, facilitating in the reviewing and editing of the manuscript.

MICROSOFT WORD TEMPLATE

It is advisable that authors prepare their manuscript using the template available on the Web, which will assist in preparation of the manuscript according to Journal's Format. [Download the Template](#).

Our contracted service provider [Eureka Science](#) can, if needed, provide professional assistance to authors for the improvement of English language and figures in manuscripts.

SECTIONS IN MANUSCRIPTS

Manuscripts submitted for research and review articles in the journal should be divided into the following sections:

- Title
- Title page
- Structured Abstract
- Graphical Abstract
- Keywords
- Text Organization
- Conclusion
- List of Abbreviations (if any)
- Consent for Publication
- Conflict of Interest
- Acknowledgements
- References
- Appendices
- Figures/Illustrations (if any)
- Chemical Structures (if any)
- Tables (if any)
- Supportive/Supplementary Material (if any)

Title

The title of the article should be precise and brief and must not be more than 120 characters. Authors should avoid the use of non-standard abbreviations. The first letter of each word should be in capital letters except for articles, conjunctions and prepositions.

Authors should also provide a short ‘running title’. Title, running title, byline, correspondent footnote and keywords should be written as presented in original manuscripts.

Title Page

Title page should include paper title, author(s) full name and affiliation, corresponding author(s) names complete affiliation/address, along with phone, fax and email.

Structured Abstract

The abstract of an article should be its clear, concise and accurate summary, having no more than 250 words, and including the explicit sub-headings (as in-line or run-in headings in bold). Use of abbreviations should be avoided and the references should not be cited in the abstract. Ideally, each abstract should include the following sub-headings, but these may vary according to requirements of the article.

- Background
- Objective
- Method
- Results
- Conclusion

Graphical Abstract

A graphic must be included with each manuscript for use in the Table of Contents (TOC). This must be submitted separately as an electronic file (preferred file types are EPS, PDF, TIFF, Microsoft Word, PowerPoint and CDX etc.). A graphical abstract, not exceeding 30 words along with the illustration, helps to summarize the contents of the manuscript in a concise pictorial form. It is meant as an aid for the rapid viewing of the journals' contents and to help capture the readers attention. The graphical abstract may feature a key structure, reaction, equation, etc. that the manuscript elucidates upon. It will be listed along with the manuscript title, authors names and affiliations in the contents page, typeset within an area of 5 cm by 17 cm, but it will not appear in the article PDF file or in print.

Graphical Abstracts should be submitted as a separate file (must clearly mention graphical abstract within the file) online via Bentham's Content Management System by selecting the option supplementary material .

Keywords

6 to 8 keywords must be provided.

Text Organization

The main text should begin on a separate page and should be divided into title page, abstract and the main text. The text may be subdivided further according to the areas to be discussed, which should be followed by the List of Abbreviations (if any), Conflict of Interest, Acknowledgements and Reference sections. For review, the manuscript should be divided into title page, abstract and the main text. The text may be subdivided further according to the areas to be discussed, which should be followed by the Acknowledgements and Reference sections. For Research Articles the manuscript should begin with the title page and abstract followed by the main text, which must be structured into separate sections as **Introduction, Material and Methods, Results,**

Discussion, Conclusion, Conflict of Interest, Acknowledgements and References.

The Review Article should mention any previous important recent and old reviews in the field and contain a comprehensive discussion starting with the general background of the field. It should then go on to discuss the salient features of recent developments. The authors should avoid presenting material which has already been published in a previous review. The authors are advised to present and discuss their observations in brief. The manuscript style must be uniform throughout the text and 10 pt Times New Roman fonts should be used. The full term for an abbreviation should precede its first appearance in the text unless it is a standard unit of measurement. The reference numbers should be given in square brackets in the text. Italics should be used for Binomial names of organisms (Genus and Species), for emphasis and for unfamiliar words or phrases. Non-assimilated words from Latin or other languages should also be italicized e.g. *per se*, *et al.*, etc.

SECTION HEADINGS

Section headings should be numbered sequentially, left aligned and have the first letter capitalized, starting with the introduction. Sub-section headings however, should be in lower-case and italicized with their initials capitalized. They should be numbered as 1.1, 1.2, etc.

INTRODUCTION

The Introduction section should include the background and aims of the research in a comprehensive manner.

MATERIALS AND METHODS

This section provides details of the methodology used along with information on any previous efforts with corresponding references. Any details for further modifications and research should be included.

EXPERIMENTAL

Repeated information should not be reported in the text of an article. A calculation section must include experimental data, facts and practical development from a theoretical perspective.

RESULTS

Results should be precise.

DISCUSSION

This should explore the significance of the results of the work, present a reproducible procedure and emphasize the importance of the article in the light of recent developments in the field. Extensive citations and discussion of published literature should be avoided.

The Results and Discussion may be presented together under one heading of Results and Discussion. Alternatively, they may be presented under two separate sections (Results section and Discussion Sections). Short sub-headings may be added in each section if required.

CONCLUSION

A small paragraph summarizing the contents of the article, presenting the final outcome of the research or proposing further study on the subject, may be given at the end of the article under the Conclusion section.

Greek Symbols and Special Characters

Greek symbols and special characters often undergo formatting changes and get corrupted or lost during preparation of manuscript for publication. To ensure that all special characters used are embedded in the text, these special characters should be inserted as a symbol but should not be a result of any format styling (Symbol font face) otherwise they will be lost during conversion to PDF/XML.

Authors are encouraged to consult reporting guidelines. These guidelines provide a set of recommendations comprising a list of items relevant to their specific research design. Chemical equations, chemical names, mathematical usage, unit of measurements, chemical and physical quantity & units must conform to SI and Chemical Abstracts or IUPAC.

All kinds of measurements should be reported only in International System of Units (SI).

Appendices

In case there is a need to present lengthy, but essential methodological details, use appendices, which can be a part of the article. An appendix must not exceed three pages (Times New Roman, 10 point fonts, 900 max. words per page). The information should be provided in a condensed form, ruling out the need of full sentences. A single appendix should be titled APPENDIX, while more than one can be titled APPENDIX A, APPENDIX B, and so on.

Supportive/Supplementary Material (if any)

We do encourage to append supportive material, for example a PowerPoint file containing a talk about the study, a PowerPoint file containing additional screenshots, a Word, RTF, or PDF document showing the original instrument(s) used, a video, or the original data (SAS/SPSS files, Excel files, Access Db files etc.) provided it is inevitable or endorsed by the journal's Editor.

Supportive/Supplementary material intended for publication must be numbered and referred to in the manuscript but should not be a part of the submitted paper. In-text citations as well as a section with the heading "Supportive/Supplementary Material" before the "References" section should be provided. Here, list all Supportive/Supplementary Material and include a brief caption line for each file describing its contents.

Any additional files will be linked to the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the paper. They will be made available in exactly the same form as originally provided only on our Web site. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet). Supportive/Supplementary material must be provided in a single zipped file not larger than 4 MB.

Authors must clearly indicate if these files are not for publication but meant for the reviewers'/editors' perusal only.

List of Abbreviations (if any)

If abbreviations are used in the text either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided.