

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Efeito do Óleo Essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth e compostos
majoritários em linhagens tumorais**

Dissertação de Mestrado

Paula Regina Manini

Porto Alegre

2015

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Efeito do Óleo Essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth e compostos
majoritários em linhagens tumorais**

Paula Regina Manini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jenifer Saffi

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Dinara Jaqueline Moura

Porto Alegre

2015

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

A professora Jenifer Saffi, pela oportunidade, acolhida, amizade, ensinamentos, por ser tão generosa e principalmente pela compreensão e paciência. Muito obrigada!

A professora Dinara, pela caminhada, acolhida, ensinamentos, apoio, incentivos e muita compreensão. Muito Obrigada!

A Valéria pelos conhecimentos compartilhados, por toda ajuda e muitas risadas.

Aos colegas do laboratório de Genética Toxicológica, por toda ajuda, disponibilidade e carinho compartilhados ao longo da jornada.

A Fran pela amizade sempre, ao Jeff pelas inúmeras ajudinhas e muitas risadas e a Jaque pelos conselhos, dicas, incentivos e experiências compartilhadas.

A Paulinha por todo apoio, parceria, risadas, dilemas, amizade e compreensão.

A professora Márcia Wink por aceitar ser relatora deste trabalho, te admiro de longa data.

Aos membros da banca, muito obrigada.

A minha família

A Matheus pelo afeto, apoio, paciência e por facilitar todas as coisas pra mim. Muito obrigada!

A todos que de qualquer forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, sem ele nada seria possível.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
1.INTRODUÇÃO	
1.1Plantas Medicinais.....	13
1.1.2 <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth.....	14
1.1.2.1 Composição química e atividades farmacológicas da <i>Piper gaudichaudianum</i>	16
1.2 Óleos Essenciais	19
1.2.1Aspectos gerais.....	19
1.2.2 Óleo essencial de <i>Piper gaudichaudianum</i>	21
1.2.3Compostos majoritários do óleo essencial de <i>Piper gaudichaudianum</i>	23
1.2.3.1 Nerolidol.....	24
1.2.3.2 α -humuleno.....	25
1.2.3.3 β -cariofileno.....	27
1.3 Câncer e resistência tumoral.....	28
1.3.1 Câncer.....	30
1.3.2 Células tumorais.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

OBJETIVOS.....	48
1. Objetivo geral.....	48
1.1. Objetivos Específicos.....	48
 CAPÍTULO I.....	49
<i>Piper gaudichaudianum</i> essential oil is a selective cytotoxic for tumor cell lines.....	50
CONCLUSÕES.....	75
PERSPECTIVAS.....	76
ANEXO.....	77
Normas da Revista.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM	concentração inibitória mínima
c-myc	proto-oncogene
COX-2	ciclooxigenase-2
DCFH-DA	2'7'-diclorofluoresceína diacetato
DNA	ácido desoxirribonucléico
ERO	espécies reativas de oxigênio
FAAD	<i>Fas-associated death domain</i>
FDA	Food and Drug Administration
GC/MS	cromatografia gasosa e espectrometria de massa
GC-FID	cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama
GSH	glutathione
IC ₅₀	concentração inibitória de 50%
MAPKs	<i>mitogen activated protein kinases</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i> ou resistência multifármaco
MMR	mismatch repair
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
mTOR	mammalian target of rapamycin (proteína serina/ treonina)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Arbusto característico de <i>Piper gaudichaudianum</i> kunth.....	15
Figura 2- Estrutura química (E)-Nerolidol.....	23
Figura 3- Estrutura química α - humuleno.....	24
Figura 4- Estrutura química β – cariofileno.....	26

Capítulo I

Figura 1- Chromatogram of a majority peak in the <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil (A) and the chromatogram of identification peak in the standards (B).....	58
--	----

Figura 2 - Cytotoxic effects of <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil in normal cell (Hek293T) and tumoral cell lines (HCT116 e MCF7), after 24 h exposure by MTT assay. Results are expressed as mean percentage in treated cells compared to control (solvent) $\pm$ standard deviation of three independent experiments. In detail the IC ₅₀ value for each cell line.....	59
--	----

Figura 3- Cytotoxic effects of <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil in normal cell (Hek293T) and tumoral cell lines (HCT116 e MCF7), after 96 h exposure by MTT assay. Results are expressed as mean percentage in treated cells compared to control (solvent) $\pm$ standard deviation of three independent experiments. In detail the IC ₅₀ value for each cell line.....	59
---	----

Figura 4 - Cytotoxic effects of (E)-caryophyllene (A), α -humulene (B) and (E)-nerolidol (C) in normal cell (Hek293T) and tumoral cell lines (HCT116 e MCF7), after 24 h exposure by MTT assay. Results are expressed as mean percentage in treated cells compared to control (solvent) $\pm$ standard deviation of three independent experiments. In detail the IC ₅₀ value for each cell line.....	60
--	----

Figura 5- Evaluation of <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil on HCT116 and MCF7 cells ROS formation (A), mitochondrial depolarization (B) and DNA damage (C) at the	
--	--

indicated concentrations for 24 h. The negative control was treated with the vehicle (DMSO) used to dilute the essential oil. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments in triplicate. *Significant difference as compared to negative control treatment at $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ /One-way ANOVA/Dunnett's Multiple Comparison Test.....62

Figura 6- Representative histogram from evaluation of *P. gaudichaudianum* essential oil on Hek293-T, HCT116 and MCF7 cells by DCF oxidation as measured of the ROS formation. In detail the percent increase of fluorescence intensity of dye fluorescent compound DCF for each cell line.....62

Figura 7- Cell death induction in HCT116 (A) and MCF7 (B) cells after *P. gaudichaudianum* essential oil. Quantification of the viable cells (unlabeled with either annexin-V or 7-AAD), early apoptosis (labeled with annexin V-PE), late apoptosis (labeled with both annexin V-PE and 7-AAD) and necrosis apoptosis (labeled with 7-AAD). The negative control was treated with the vehicle (DMSO) used to dilute the essential oil. Bars represent the mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments in triplicate. The percentage of annexin-V-positive cells was determined in the whole-cell population (10,000 cells) by FACSCalibur flow cytometry and CELLQuest software. *Significant difference as compared to negative control treatment, in each type of labeling, at $P<0.05$; *** $P<0.001$ /One-way ANOVA/Dunnett's Multiple Comparison Test.....64

Figura 8- Representative dot blot of the cell death profile after *P. gaudichaudianum* essential oil treatment in HCT116 (A) and MCF7 (B) cells analyzed by flow cytometry analysis with the x axis showing Annexin V-phycoerythrin (PE) staining and the y axis 7-amino-actinomycin D (7-AAD).....65

Figura 9- Regression linear of the relationship between *P. gaudichaudianum* effects in HCT116 (A) and MCF7 (B) cells. Correlation between survival and oxidative stress, mitochondrial depolarization or DNA damage.....73

Figura 10-Schematic representation of the plausible molecular mechanism proposed for the induction of cytotoxicity by *P. gaudichaudianum* essential oil.74

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1 - GC-BID calibration range, calibration equation, correlation coefficient (R^2) and quantitative results for terpenes of <i>P. gaudichaudianum</i> essential oil.....	57
--	----

RESUMO

Introdução: O gênero *Piper* é distribuído principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo e tem sido amplamente investigado como fonte de novos produtos naturais com potencial antifúngico, antitumoral e propriedades antioxidantes. Estudos têm demonstrado que o óleo essencial da *Piper gaudichaudianum* exerce efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos em células de mamíferos V79. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a citotoxicidade observada do óleo essencial e do composto majoritário nerolidol está relacionado com produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e pela presença de lesões oxidativas geradas pelas quebras no DNA. **Objetivos:** Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial *Piper gaudichaudianum* e os seus principais compostos, (E)-nerolidol, α -humuleno e β -cariofileno, utilizando células tumorais (HCT116 e MCF7) e não tumoral (Hek293T). **Métodos:** As linhagens celulares foram tratadas com diferentes concentrações de 2.5 - 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ no tempo de 24h. O ensaio de citotoxicidade foi determinado pelo teste de MTT; a produção de espécies reativas de oxigênio por ensaio DCF-DA; a despolarização mitocondrial usando Rodamina 123; a avaliação de dano ao DNA por ensaio Cometa e a morte celular (apoptose e necrose) foi analisada por anexina V-PE / 7-AAD. **Resultados:** O óleo essencial induziu efeitos citotóxicos nas linhagens tumorais, enquanto que os compostos isolados não demonstraram o mesmo efeito. O óleo essencial induziu um aumento da geração de ERO em células HCT116, maior do que a observada em células MCF7. O óleo essencial de *P. gaudichaudianum* induziu um aumento significativo no índice de dano de DNA nas concentrações mais elevadas 10 e 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ na HCT116, e 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ na MCF7 e indução de morte nas doses mais altas. **Conclusão:** o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* é citotóxico, induz despolarização mitocondrial significativa e morte celular por necrose em linhagens tumorais e esta citotoxicidade não é dependente da ação isolada dos seus componentes majoritários. Estes dados incentivam mais estudos para investigar o mecanismo de ação e potenciais usos do óleo essencial e seus principais compostos.

Palavras-chaves: óleo essencial. *Piper gaudichaudianum*.citotoxicidade.morte celular.

ABSTRACT

Introduction: The genus *Piper* is mainly distributed in tropical and subtropical regions worldwide and has been widely investigated as a source of novel natural products with potential antifungal, antitumor and antioxidant properties. Previous studies have shown that the essential oil of *Piper gaudichaudianum* exerts cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects on V79 mammalian cells, and in *Saccharomyces cerevisiae* the cytotoxicity of the essential oil and its major compound, nerolidol, is related to the production of reactive oxygen species (ROS) and to the presence of oxidative lesions generated by DNA breaks. **Objective:** To evaluate the cytotoxicity of the essential oil of *P. gaudichaudianum* and its major compounds, (*E*)-nerolidol, α -humulene and (*E*)-caryophyllene, using tumor (HCT116 and MCF7) and normal (Hek293T) cell lines. **Methods:** Cells were treated with different concentrations 2.5 – 40 μ g/mL of the essential oil and its major compounds for 24h. Cytotoxicity was assessed by MTT assay; ROS production was evaluated by DCF-DA; mitochondrial depolarization was measured with Rhodamine 123; DNA damage was assessed with comet assay; and cell death (apoptosis and necrosis) was analyzed with annexin V-PE and 7-AAD. **Results:** The essential oil induced cytotoxic effects in both tumor cell lines, whereas the isolated compounds did not present cytotoxicity. The ROS generation induced by the essential oil was greater in HCT116 cells than in MCF7 cells. The essential oil of *P. gaudichaudianum* significantly increased the DNA damage index at the highest concentrations: 10 and 20 μ g/mL in HCT116, and 20 μ g/mL in MCF7 cells and induction of death in higher doses. **Conclusion:** the essential oil of *P. gaudichaudianum* induce cytotoxicity, as well as significant mitochondrial depolarization and cell death due to necrosis in tumor cells. Moreover, its cytotoxicity is not dependent on the isolated action of its major compounds. These data encourage further studies in order to investigate the mechanism of action and potential uses of the essential oil and its major compounds.

Key-words: essential oil; *Piper gaudichaudianum*; cytotoxicity; cell death.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas medicinais

As plantas são fontes importantes de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Apesar da grande participação brasileira, as pesquisas científicas sobre as plantas tradicionais utilizadas ainda são recentes e pouco documentadas em função da disponibilidade e uso de plantas nativas para fins terapêuticos, devido às alterações ambientais. A utilização de plantas na cura e alívio de doenças, contribui para avanço de pesquisas científicas relacionadas a fitoquímica e farmacologia (Wang et al., 2014; Bratti, 2013).

Os produtos naturais são fonte de inspiração para diversas áreas, inclusive na produção de fármacos, como por exemplo a obtenção de medicamentos através de várias plantas: digoxina (*Digitalis* spp.), quinina e quinidina (*Cinchona* spp.), vincristina e vinblastina (*Catharanthus roseus*), atropina (*Atropa belladonna*), morfina e codeína (*Papaver somniferum*) (Brazão, 2012; Lima et al., 2007).

O uso da fitoterapia na prática médica vem crescendo ao longo dos anos na busca de novas alternativas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças de grande impacto, como por exemplo, o câncer. A própria Organização Mundial de Saúde (OMS), reconhece e encoraja a preservação e promoção do conhecimento oriundo das plantas medicinais, sendo o Brasil o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, com compostos bioativos e espécies com propriedades medicinais comprovadas (Brandão et al., 2013).

Neste contexto, as plantas aparecem como uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas como agentes medicinais. Além disso, fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas servindo, inclusive, para a inspiração de químicos sintéticos, estimulando-os para enfrentar desafios na construção sintética de novas arquiteturas moleculares naturais (Braz Filho, 2010).

O uso da fitoterapia vem demonstrando crescimento visível ao longo dos anos na busca de novas alternativas na prática médica e farmacêutica, buscando consolidação na área científica (Brandão et al., 2010).

As plantas medicinais representam um importante componente econômico e de conservação da biodiversidade. Informações do conhecimento tradicional de plantas

medicinais e seus usos representa um papel vital na descoberta de novos produtos a partir de plantas como agentes quimioterápicos. Membros do gênero *Piper* são de grande importância comercial, econômica e medicinal. Estas espécies tem sido extensivamente investigada como uma fonte de novos produtos naturais com potenciais atividades antitumoral, antimicrobiana, antifúngica e inseticida (Lago et al., 2004).

Deste modo, o presente trabalho objetiva contribuir para a pesquisa científica no que se refere a investigação fitoquímica e farmacológica do óleo essencial de *P.gaudichaudianum* e seus compostos majoritários, na perspectiva de encontrar um produto natural com possível atividade antitumoral.

1.1.2. *Piper gaudichaudianum* Kunth

A família Piperaceae possui cerca de três mil espécies distribuídas em oito gêneros, dos quais se destacam os gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Pothomorphe*. Incluindo ervas, arbustos e arvoretas, frequentemente epífitas ou lianas. O caule é nodoso, as folhas são alternas, simples, com margem inteira, pecioladas, com ou sem estípulas (Yano et al., 2012). Espécies dessa família encontram-se distribuídas por toda a América. No Brasil ocorrem cinco gêneros e cerca de 500 espécies, encontradas principalmente na Mata Atlântica. 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 também pela indústria de inseticidas (Puhl et al., 2011).

Diversas espécies do gênero *Piper* são usadas na medicina popular e muitas têm importância econômica, especialmente devido à presença de conteúdo oleífero em suas estruturas. Dentre as espécies com tal característica estão *Piper crassinervium* H.B. & K., conhecida como jaborandi, *Piper hispidinervium* C.DC. (pimenta-longa), *P. aduncum* L. (pimenta-de-macaco), *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), entre outras (Araújo et al., 2012).

Devido à presença dos óleos essenciais nas espécies de Piperaceae, vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de identificar os componentes químicos presentes nas suas estruturas. No entanto, são poucas as informações disponíveis na literatura sobre a anatomia e morfologia das estruturas das plantas destas espécies (Gogosz et al., 2012).

No gênero *Piper* destacam-se espécies como a pimenta, *P. nigrum*, e espécies medicinais de ampla utilização, como a *Piper betle*, *Piper longum*, *Piper angustifolium*, *Piper methysticum*, *Piper tuberculatum* Jacq. e *Piper aduncum* L. de grande importância

em sistemas tradicionais de medicina, como, por exemplo, a chinesa (Di Stiasi e Hiruma-Lima, 2002). Investigações fitoquímicas realizadas com espécies do gênero *Piper* têm conduzido ao isolamento de várias classes de compostos ativos, tais como: amidas, alcalóides, profenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, chalconas, dihidrochalconas, flavonas e flavononas (Puhl et al., 2011; Ghosh, 2014).

Piper gaudichaudianum Kunth (Figura 1) é uma planta da família Piperaceae, que se desenvolve em toda a Mata Atlântica, sendo conhecida popularmente como “pariparoba” no Sul do Brasil e “jaborandi ou iaborandi” nas outras partes do Brasil (Péres et al., 2009). 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 8 cm de comprimento (Di Stiasi e Hiruma-Lima, 2002).



Figura 1 - Arbusto característico de *P. gaudichaudianum* (Sperotto, 2012).

A *P. gaudichaudianum* é uma espécie amplamente coletada para comercialização como adulteração do jaborandi verdadeiro, pois apresenta grande semelhança morfológica (Di Stiasi e Hiruma-Lima, 2002). Floresce durante todo o ano e frutifica em janeiro, março, agosto e de outubro a dezembro. As maiores das espécies desse gênero apresentam 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 como morcegos e pássaros (Nascimento, 2011).

Na região da Mata Atlântica, tanto a infusão das folhas, como as folhas frescas de *P. gaudichaudianum* são utilizadas para aliviar a dor de dente, ao passo que as raízes frescas são mastigadas em função do seu efeito anti-inflamatório, sendo também utilizadas no tratamento de distúrbios hepáticos (Di Stiasi e Hiruma-Lima, 2002).

1.1.2.1. Composição química e atividades farmacológicas de *Piper gaudichaudianum*

Os estudos referentes aos extratos fitoquímicos da *P. gaudichaudianum* têm mostrado uma grande diversidade de metabólitos com marcantes atividades biológicas. Rorig et al., (1991) identificaram a presença de flavonóides (traços), triterpenos e alcaloides. No estudo realizado por Stipp (2000), que permitiu a caracterização qualitativa dos componentes presentes nas folhas, foram encontrados metabólitos secundários como, catequinas, esteroides, flavonas, flavonoides, saponinas, taninos catéquicos, triterpenos pentacíclicos e xantonas.

Teixeira (2003) identificou os componentes voláteis em doze amostras diferentes de frutos de *P. gaudichaudianum*, sendo seis destas extraídas pelo método de aeração: frutos

imaturos coletados pela manhã (majoritários: 31% de β -cariofileno e 9,11% de sabineno), frutos imaturos coletados pela tarde (majoritários: 21,07% de sabineno e 20,87 de β -cariofileno), frutos imaturos coletados pela noite (majoritários: 21,44 de β -cariofileno e 16,24% de sabineno), frutos maduros coletados pela manhã (majoritários: 11,06% de sabineno e 8,69% de *trans*-Hidrato do sabineno), frutos maduros coletados pela tarde (majoritários: 12,75% de sabineno e 12,62% de α -humuleno), e frutos maduros coletados pela noite (majoritários: 3,83% de sabineno e 2,97% de aromadendreno). Outras seis amostras de frutos, extraídas pelo método de hidrodestilação, também foram avaliadas: frutos imaturos coletados pela manhã (majoritários: 15,43% de β -cariofileno e 10,45% de α -humuleno), frutos imaturos coletados pela tarde (majoritários: 14,68% de fenchona e 13,91% de (*E*)-nerolidol), frutos imaturos coletados pela noite (majoritários: 17,26% de fenchona e 11,45% de (*E*)-nerolidol), frutos maduros coletados pela manhã majoritários: 10,76% de β -cariofileno e 2,79% de α -humuleno), frutos maduros coletados pela tarde (majoritários: 15,74% de β -cariofileno e 10,67% de α -humuleno), e frutos maduros coletados pela noite (majoritários: 10,80% de α -humuleno e 8,38% de linalol).

Péres et al. (2006) em estudo da composição das folhas e inflorescências de *P. gaudichaudianum* encontraram os seguintes componentes majoritários nas flores, α -humuleno (23,05%), β -cariofileno (10,40%) e o β -pineno (7%). Nas folhas foram identificados o (*E*)-nerolidol (38,13%), α -humuleno (18,00%) e β -cariofileno (8,24%). Posteriormente, foi quantificada uma série de compostos de dois extratos com polaridades diferentes, o éter de petróleo e o etanólico. Os compostos identificados e quantificados nos dois extratos foram o (*E*)-nerolidol, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido 9, 12,15-octadecatrienóico, fitol, ácido esteárico, ácido lignocérico, esqualeno, vitamina E, estigmasterol e β -sitosterol.

O uso tradicional da *P. gaudichaudianum* é fundamentalmente como anti-inflamatório e analgésico. Entretanto, estudos com o extrato aquoso para avaliação de atividade analgésica (1000 mg Kg⁻¹ de sólidos totais, via oral em camundongos), pelo modelo de contorções abdominais induzidas por peróxido de benzoila, não revelaram um efeito promissor. O extrato diminuiu a frequência das contorções em alguns dos intervalos testados, entretanto, não ficou definido qual o período crítico para a caracterização da melhor atividade analgésica. Além disso, os efeitos observados foram de curta duração, sendo que não houve atividade analgésica detectada no teste de imersão de cauda (Di Stiasi, 1987).

Em análise dos extratos das folhas de *P. gaudichaudianum*, Pulh et al. (2011) testaram a atividade antimicrobiana do extrato bruto aquoso, o qual apresentou uma boa atividade contra *Bacillus subtilis* e *Cândida tropicalis* (concentração inibitória mínima (CIM)=62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$), uma atividade moderada contra *Staphylococcus aureus* (CIM=250 $\mu\text{g ml}^{-1}$), e uma atividade fraca contra *Trichophyton rubrum* (CIM=1.000 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A fração hexânica mostrou boa atividade contra *C. tropicalis* (CIM=62,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e atividade moderada contra *T. rubrum* (CIM=500 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A fração diclorometano-acetato de etila (50:50) mostrou boa atividade contra *B. subtilis* (CIM=31,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$), atividade moderada contra *S. aureus* (CIM=125 $\mu\text{g ml}^{-1}$), *C. tropicalis* (CIM=250 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e *T. rubrum* (CIM=500 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A fração acetato de etila mostrou atividade moderada contra *C. tropicalis* (CIM=500 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Espécies de *Piper* têm sido relatadas na literatura para tratamento de diversos tumores e/ou sintomas relacionados em muitos países, como por exemplo, no México a *Piper aduncum* L. é usada em tumores de pele e problemas dermatológicos, ainda o extrato diclorometano de *P. aduncum* apresenta citotoxicidade em células de glioma (SF-268), carcinoma de pulmão (H-460) e carcinoma de mama (MCF7) com os valores de IC_{50} 23, 25, e 27 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. *Piper cubeba*, espécie originária da Ásia, sendo o fruto seco conhecido como *pimenta-de-java*, foi citada como uma das plantas mais importantes contra o câncer de próstata, visando múltiplos aspectos da via de sinalização androgênica. Ainda os extratos brutos das espécies *P. aduncum* L., *Piper barbatum* Kunth, *Piper fragile* Benth. *Piper jacquemontianum* Kunth, e *Piper pellucidum* L. foram avaliados para citotoxicidade *in vitro* e mostraram atividade inibidora ($\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$) contra pelo menos um tipo de tumor com valor de IC_{50} inferior 4 $\mu\text{g/ml}$ (Wang et al., 2014).

As indicações medicinais populares para as enfermidades em que esta planta é utilizada são as seguintes: como diurético, para reumatismo, bronquite, cicatrizante, diabetes, doenças venéreas, anti-inflamatório, tônico, ferimentos, expectorante, infecções das vias urinárias, inflamação do fígado, problemas renais, antidiarréico, problemas estomacais e como analgésico (Bratti, 2013). Dentro deste contexto a investigação do óleo essencial é de fundamental relevância considerando os estudos abordados acima.

1.2. Óleos Essenciais

1.2.1. Aspectos gerais

Os óleos essenciais são derivados de uma variedade de fontes naturais, como plantas medicinais. Estes óleos são misturas complexas, utilizados na medicina tradicional desde a antiguidade para diversas doenças, como pneumonia, bronquite, faringite, doenças periodontais, infecções e inflamação (Boire et al., 2013). As plantas aromáticas, bem como os respectivos óleos essenciais, são utilizadas desde o início da história da humanidade para saborizar comidas e bebidas; empiricamente usadas para disfarçar odores desagradáveis, atrair outros indivíduos e controlar problemas sanitários, contribuindo também para a comunicação entre os indivíduos e influenciando o bem-estar dos seres humanos e animais, demonstrando assim uma antiga tradição socio-cultural e socio-econômica da utilização destes produtos (Franz, 2010).

Os óleos essenciais são utilizados nas indústrias alimentícia, agrônômica, sanitária, cosmética, de perfumes e nas indústrias farmacêuticas, como substâncias com atividade carminativa, antimicrobiana, inseticida, analgésica e anti-inflamatória, entre outras (Mishra e Tiwari., 2011). Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo seu apetite por essas plantas. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis (Bakkali et al., 2008).

Os óleos essenciais são compostos naturais, voláteis e complexos, caracterizados por um forte odor sendo sintetizados por metabolismo secundário das plantas e normalmente encontrados em plantas de países quentes, como as do mediterrâneo e dos trópicos, onde representam parte importante da farmacopeia tradicional. São obtidos de diferentes partes da planta, como flores, brotos, galhos, folhas, sementes e frutos, geralmente extraídos das partes da planta pelo método de destilação por arraste com vapor d'água, também conhecida por hidrodestilação (Mishra e Tiwari., 2011).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes, quando comparadas a outros medicamentos, como, por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. Vários estudos têm apontado as propriedades biológicas de óleos essenciais como antiviral, antiespasmódica,

analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, antiseptica e anti-inflamatória (Bhalla et al., 2013).

Adicionalmente, os óleos essenciais constituem uma fonte potencial de compostos com ação anticancerígena. Os componentes dos óleos essenciais são geralmente de fácil acesso e contém uma grande variedade de estruturas. Com o auxílio de técnicas cromatográficas, sua composição química pode ser analisada mais profundamente do que a maior parte dos extractos naturais não-voláteis. Isto facilita consideravelmente a identificação dos componentes ativos individuais. Além disso, apesar da aparente simplicidade das suas estruturas, a combinação do baixo peso molecular com um caráter apolar frequentemente resulta na boa biodisponibilidade de muitos destes óleos, o que entre outros fatores tem despertado interesse da comunidade médica como uma alternativa em potencial as quimioterapias atuais (Lesgards et al., 2014). Os óleos e seus componentes individuais já mostraram atividade supressora tumoral quando testadas em linhagens tumorais, como glioma, câncer de colon, câncer gástrico, tumor hepático, câncer de mama, leucemias entre outros (Edris, 2007; Bhalla et al., 2012; Lesgards et al., 2014).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, mas as condições ambientais são capazes de provocar variações significativas. A insolação, temperatura, umidade do ar e o tipo de solo, especialmente no que diz respeito à disponibilidade de água pelas plantas, são fatores que afetam a produção dos óleos essenciais. Na grande maioria, são constituídos de substâncias terpênicas,

monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), e frequentemente de fenilpropanóides. A

época de colheita, o horário e o modo de secagem do material vegetal também são fatores fundamentais (Franz, 2010).

Devido ao grande número de constituintes presentes nos óleos essenciais, é provável que estes não possuam alvos celulares específicos. De fato, análises realizadas por microscopia eletrônica revelam que os mesmos alteram os diferentes compartimentos celulares, como a membrana plasmática, o citoplasma e o núcleo (Bakkali et al., 2007).

Os óleos essenciais e seus componentes apresentam característica hidrofóbica

permitindo a sua interação com membranas celulares. Sendo assim, possuem capacidade de penetrar na célula e interagir com componentes intracelulares ou, ainda, atuar no rompimento das membranas celulares. Isto ocasiona a perda da permeabilidade seletiva da célula, levando ao comprometimento de suas funções e, por fim, em eventual morte celular (Cristiani et al., 2007).

As propriedades farmacêuticas das plantas aromáticas são em parte devidas aos seus óleos essenciais. Por esse motivo, esses compostos estão sendo pesquisados para a utilização na terapia do câncer, uma vez que estudos demonstram suas propriedades tanto na quimioterapia quanto na quimioprevenção.

1.2.2. Óleo essencial da planta *P. gaudichaudianum*

As análises da composição química do óleo essencial das folhas de *P. gaudichaudianum* descrevem os terpenos como principais componentes. Rorig et al. (1991) identificaram por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa (GC/MS), com rendimento de 0,30%, como principais constituintes do óleo essencial das folhas de *P. gaudichaudianum*, os compostos d-limoneno, citral A, citral B, geraniol, linalol β -cariofileno e para-cimeno. Poser et al. (1994), em outro estudo com o óleo essencial das folhas coletadas na mesma região da amostra do trabalho anterior, apresentando o mesmo rendimento, determinaram a presença de 12% de monoterpenos, sendo os principais o β -pineno e o linalol, e 85% de sesquiterpenos, especialmente o α -humuleno (37,5%) e o β -cariofileno (17,45 %). Andrade et al. (1998) analisaram duas amostras do óleo essencial de partes aéreas de *P. gaudichaudianum*. A primeira (A) amostra obteve rendimento de 0,8% e a segunda amostra (B) rendimento de 0,6% na produção de óleo essencial. Os constituintes majoritários em ambas as amostras foram β -cariofileno (A:12,1%; B:19,3%), α -humuleno (A:13,3%; B:29,2%), β -selineno (A:15,7%; B:3,7%) e α -selineno (A:16,6%; B:8,9%).

De Moraes et al. (2007) realizaram uma pesquisa de óleos essenciais de plantas do gênero *Piper* com potencial larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*. Nesse trabalho, extraíram e analisaram o óleo essencial das folhas de *P. gaudichaudianum*, onde os componentes majoritários foram viridiflorol (27,50%), aromadendreno (15,55%), β -selineno (10,50%) e selin-11-em-alfa-ol (8,48%). Nos estudos com o óleo essencial das folhas, utilizando cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC-FID) e GC/MS, identificou-se 87,6% de sesquiterpenos, sendo os principais (*E*)-nerolidol

(22,4%), α -humuleno (16,5%), (E)-cariofileno (8,9%) e biciclogermacreno (7,4%) (Péres et al., 2009).

Entre as atividades biológicas descritas para o óleo inclui-se a atividade larvicideira contra *Aedes aegypti* ($IC_{50} = 121 \mu\text{g mL}^{-1}$) (De Moraes et al., 2007). Neste estudo, a atividade foi considerada baixa em relação aos outros óleos essenciais testados, ricos em fenilpropanóides. Também foi demonstrado que o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* apresenta uma alta atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (CIM) = 62.5 mg mL^{-1}) e *Candida krusei* (CIM = 31.25 mg mL^{-1}) (Morandim-Giannetti et al., 2010).

Péres et al. (2009) verificaram o efeito tóxico, mutagênico e genotóxico do óleo essencial utilizando células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (células V79). A citotoxicidade do óleo essencial foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium), de exclusão com azul de Trypan (TB) e sobrevivência clonogênica, verificando-se que o óleo essencial induz citotoxicidade dose dependente ($IC_{50} = 4.0 \mu\text{g/mL}$). Foi detectado a indução de danos no DNA pelo ensaio cometa alcalino, o qual analisa quebras de cadeia simples e dupla do DNA e sítios álcali-labeis, a partir da dose de $2.0 \mu\text{g/mL}$. Na versão neutra do ensaio, que analisa somente formação de quebras duplas no DNA, foi verificado que o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* não induz formação de quebras duplas. No teste de micronúcleo foi verificada indução significativa de danos no DNA a partir da concentração de $4.0 \mu\text{g/mL}$. Na avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBA) detectou-se um aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) a partir da concentração de $2.0 \mu\text{g/mL}$. Dados de regressão linear destes resultados indicam que as ERO têm um papel importante na citotoxicidade e genotoxicidade deste óleo, indicando a capacidade deste em afetar o equilíbrio redox celular. Os efeitos encontrados neste estudos estão relacionados a presença dos compostos (E)-nerolidol, α -humuleno e (E)-cariofileno, que já se sabe, possuem atividade citotóxicas (Legault et al., 2003).

Sperotto et al. (2013) verificaram que tanto óleo essencial quanto o seu composto majoritário nerolidol apresentam efeito citotóxico nas linhagens XV185 e N123 de *Sacharomyces cerevisiae*, nas concentrações de 50 e $100 \mu\text{g/mL}$. Também, utilizando mutantes deficientes na enzima superóxido dismutase e linhagens deficientes em vias de reparo do DNA, verificaram um aumento da sensibilidade nos ensaios com óleo essencial de *P. gaudichaudianum* e nerolidol, assim ambos apresentam a capacidade de gerar ERO, que pode estar relacionado ao mecanismo de ação, de acordo com estudo de Ferreira et al.

(2011), que demonstraram que o nerolidol pode afetar a função da membrana mitocondrial, diminuindo a viabilidade celular via interação com membrana, aumentando a quantidade de ERO e diminuindo a quantidade de ATP. Estes resultados sugerem que a citotoxicidade está relacionada com geração de quebras simples decorrentes da geração de lesões oxidativas, sendo o nerolidol o principal responsável pelos efeitos biológicos induzidos pelo óleo essencial de *P. gaudichaudianum*.

De acordo com os dados obtidos na literatura, as principais atividades descritas para o óleo essencial das folhas *P. gaudichaudianum* são: atividade larvicida moderada, antifúngica, citotóxica em células V79, citotóxica em *S. cerevisiae*. Estas ações estão correlacionadas com a capacidade de formar ERO, geração de quebras simples na molécula de DNA e efeito pró-oxidante.

1.2.3. Compostos majoritários do óleo essencial de *P. gaudichaudianum*

1.2.3.1. Nerolidol

O nerolidol (Figura 2) é o principal componente do óleo essencial, extraído a partir das folhas da *P. gaudichaudianum* (Péres et al., 2009). É um sesquiterpeno natural, encontrado nos óleos essenciais de muitos tipos de plantas e de grande importância econômica. Foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) como agente aromatizante de alimentos, e tem um amplo uso na indústria de cosméticos, sendo um componente importante na fixação de aromas, podendo ser encontrado nas fragrâncias de perfumes, sabonetes, xampus e artigos de higiene, produtos de limpeza e detergentes. O nerolidol é utilizado em testes de penetração da pele como um potenciador transdérmico de medicamentos (Lapczynski et al., 2008).

O nerolidol é um membro do grupo dos álcoois de cadeia insaturada e ramificada, as características estruturais deste composto correspondem a um grupo hidroxila em sua molécula, com uma cadeia de carbonos com um ou vários grupos metila ou ainda com cadeias laterais etílicas com quatro ligações simples conjugadas (Fonseca, 2012).

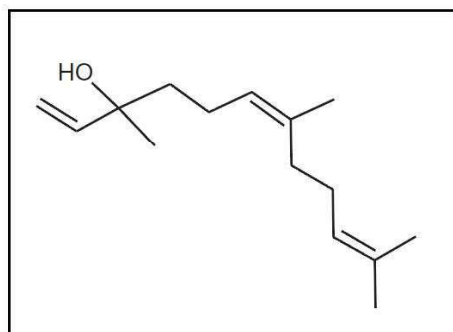


Figura 2 - Estrutura química (E)-Nerolidol (Lapczynski et al., 2008).

Brehm-Stecher e Johnson (2003) verificaram a atividade inibitória do nerolidol para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por meio de ensaios de difusão em disco, e confirmaram que o nerolidol é um bom potencializador de permeabilidade bacteriana para antimicrobianos. Lee et al. (2007) estudaram a atividade antifúngica do nerolidol em porcos infectados com *Microsporium gypseum* e analisaram por CIM a lesão de pele, cultura de cabelo e exame histopatológico dos tecidos. Com base nos CIMs o nerolidol foi clinicamente eficaz na melhora das lesões. Também foi confirmado através de ensaios *in vitro* que na dose de 100 µg/ml o nerolidol inibe em 100% o crescimento do trofozoíto esquizonte, sendo considerado um componente promissor contra o parasita da malária *Plasmodium falciparum* (Lopes et al., 1999).

Arruda et al. (2005) testaram o efeito antileishmania do nerolidol *in vitro* para o tratamento da forma promastigota da *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, e da forma amastigota da *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que o nerolidol nas concentrações de 67, 74, 75 e 85 µM apresenta atividade inibitória de 50%, tanto na forma promastigota como na amastigota. A citotoxicidade do nerolidol no parasita unicelular *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono ou tripanossomíase africana, foi demonstrada *in vitro* na dose de 1,6 µg/ml (Hoet et al., 2006).

Segundo Piculo (2011) o nerolidol provoca clastogenicidade e fraca genotoxicidade em células de camundongo, quando administrado em altas doses, devendo-se tomar cuidado ao usá-lo como agente terapêutico ou aromatizante de alimentos. Em baixas concentrações o nerolidol pode interferir negativamente no funcionamento mitocondrial hepático, causando uma citotoxicidade em células da linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2) (Ferreira et al., 2011). Embora não haja estudos sobre a

neurotoxicidade do nerolidol, sabe-se que o farnesol, sesquiterpeno com estrutura semelhante, não apresenta efeitos neurotóxicos significantes em cérebros de camundongo.

Na investigação da atividade farmacológica do nerolidol, grupos expostos de camundongos foram tratados com as doses de 300, 500, 700, 1000 e 2000 mg/kg e apresentaram alterações comportamentais sugestivas de drogas depressoras do SNC, tais como a diminuição da ambulação, da resposta ao toque e a perda do reflexo corneal e auricular (Nero et al., 2013; Fonseca, 2012).

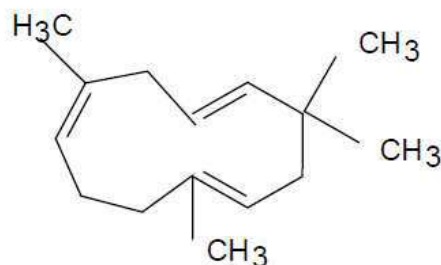
Nos estudos de Klopell et al. (2007) foi verificada a atividade antiulcerogênica do nerolidol em ratos, através da indução de lesões gástricas agudas por etanol, indometacina e por estresse. Após a indução das lesões gástricas, os ratos foram tratados com nerolidol em doses de 50, 250 e 500 mg/Kg, e foi observado que o nerolidol apresenta atividade antiulcerogênica significativa, tanto nas úlceras induzidas por indometacina quanto na por estresse, e nas lesões induzidas por etanol foi significativo as doses de 250 e 500 mg/Kg.

Nos ensaios de atividade mutagênica pelo teste Salmonella/microsoma (Teste de Ames, utilizando as linhagens TA98 e TA100), o nerolidol não foi mutagênico nas concentrações testadas de 14, 28, 56, 111 e 222 µg/placa (Gonçalves et al., 2011).

Com base nos dados da literatura relatados acima, pode-se afirmar que o nerolidol apresenta atividade de potenciador de permeabilidade bacteriana para antimicrobianos, induz efeitos citotóxicos em *S.cerevisiae*, relacionado a formação de ERO, atividade antifúngica, antileishmania, antiulcerogênica, anti-inflamatória e antiparasitária.

1.2.3.2. α - humuleno

O α -humuleno é um sesquiterpeno, encontrado na composição de diversos óleos essenciais, como por exemplo, nas espécies de Lauraceae e Piperaceae, tem destaque por sua ação anti-inflamatória, possui fórmula estrutural $C_{15}H_{24}$ e estrutura molecular apresentada na Figura 3.



α -humuleno

Figura 3 - Estrutura química (Parissoto, 2011)

Adil El Hadri et al. (2010) demonstraram uma forte atividade citotóxica do óleo essencial *S. officinalis*, o qual tem como principal componente α -humuleno, nas células LNCap (carcinoma de próstata) e nas células MCF7, a qual indicou ser mais resistente. Em um estudo de Loizzo et al., (2007), avaliou-se a citotoxicidade do óleo essencial de *S. officinalis* e *P. palestina*, que possuem como constituintes majoritários o trans-cariofileno e α -humuleno, demonstrando que o óleo essencial de cada planta foi citotóxico para células C32 (melanoma) e ACHN (adenocarcinoma renal) com valores de IC_{50} 21,81 μ g/ml e 20 μ g/ml, respectivamente, mas o α -humuleno se mostrou inativo frente a linhagem MCF7, $IC_{50} > 50\mu$ g/ml.

Vinholes et al. (2014) testaram atividade antiproliferativa de quatro sesquiterpenos, entre eles o α -humuleno, em células de câncer de colon, tratadas com 1 mM, através do ensaio MTT, em diferentes tempos: 0,5, 6, 24 e 48h. Antes de 24h de exposição ao sesquiterpeno não houve citotoxicidade, somente após 48h, houve redução de 70% na viabilidade celular, sugerindo que o composto apresenta potencial antitumoral.

Cordia verbenacea conhecida popularmente no Brasil como Erva Baleeira ou salicina é utilizada na medicina popular para o tratamento de vários processos inflamatórios. Estudos mostraram que tanto o óleo essencial de *C. verbenacea* como os seus constituintes, os sesquiterpenos α -humuleno e trans-cariofileno também encontrado em outras espécies de plantas (Rogério et al., 2009), exibem propriedades anti-inflamatórias tópicas e em diferentes modelos, reduzindo os níveis de citocinas

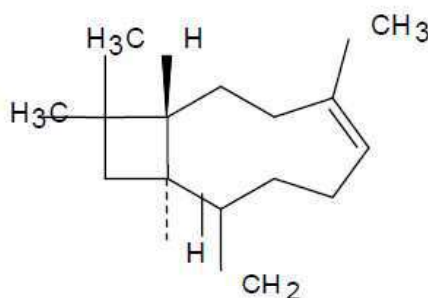
inflamatórias e a expressão da proteína pró-inflamatória através da inibição do fator nuclear kB (NF-kB) (Fernandes et al., 2007).

Araújo et al. (2014), demonstraram que o óleo essencial das folhas de *Annoma sylvatica*, nativa do Brasil e conhecida popularmente por pinha ou cortiça - amarela, composta por sesquiterpenos como hinesol, α -humuleno, Z-cariofileno entre outros, apresentou atividade antiproliferativa em diversas linhagens tumorais como MCF7, NCI-H60, PC-3, HT-29 e U251, com valores de IC₅₀ entre 36 – 45,37 μ g/ml no teste de citotoxicidade com o corante sulforodamina B (SRB), sendo que o uso deste gênero *Annona* é utilizado pela comunidade em processos inflamatórios.

Em estudo com óleo essencial de *Abies balsamea* (balsam fir oil), composto de monoterpenos e sesquiterpenos, tendo o α -humuleno como principal componente, foi avaliada atividade antitumoral em tumores como MCF7, PC-3 e A-549, sendo α -humuleno ativo contra todas linhagens testadas com IC₅₀ entre valores de 0,76 e 1,7 mg/mL. Em relação a MCF7 apresentou atividade significativa com valor de IC₅₀ = 73 μ M. Este estudo também sugere também a depleção da GSH e o aumento da produção de ERO foram induzidos pelo α -humuleno, ou seja ele seria o composto responsável pela atividade antitumoral do óleo essencial (Legault et al., 2003).

1.2.3.3 β – cariofileno

O β -cariofileno é um sesquiterpeno encontrado em muitos óleos essenciais como o de cravo, pimenta preta, erva de São João e ainda *Eugenia caryophyllata* (Fam. Myrtaceae), *Piper nigrum* L. (Fam. Piperaceae), *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell (Fam. Zinziberaceae), bem como em copaíba, *Copaifera reticulata* Ducke (Fam. Fabaceae). β -cariofileno cheira a medeira picante e ocorre como uma mistura dos isômeros isocariofileno, α -humuleno e β -cariofileno (Affonso et al., 2012). Sintetizado pela primeira vez em 1964, é descrito na literatura como anti-inflamatório, antitumoral, bactericida e repelente (Carneiro et al., 2010). Utilizado como agente aromatizante, em misturas de especiarias, sabores cítricos, sabões, detergentes, cremes e loções, e também de uma variedade de alimentos produtos e bebidas (Fernandes et al., 2007). Fórmula molecular C₁₅H₂₄ e estrutura molecular apresentada na figura 4.



β -cariofileno

Figura 4 - Estrutura química (Parissoto,2011)

Este composto apresenta importante efeito anti-inflamatório, inibindo, de acordo com Fernandes et al. (2007), a expressão da COX-2, enzima chave na sinalização do processo inflamatório. Parissoto (2011) avaliou o potencial antitumoral do extrato bruto e supercrítico (rico em α -humuleno e β -cariofileno) de *C. verbenacea*, em diferentes concentrações (31,25–1000 $\mu\text{g/ml}$) e observou uma diminuição significativa da viabilidade de células de carcinoma de Ehrlich e MCF7.

Legault e Pichette (2007), utilizando a linhagem tumoral MCF7, verificaram a citotoxicidade do óleo essencial de *Abies balsmea*, que em estudo anterior (Legault et al.,2003), identificaram os componentes α -humuleno e β -cariofileno, como compostos majoritários. Os autores avaliaram o potencial anticancer dos compostos isolados e combinados, em que as células foram tratadas nas concentrações de 16,32 a 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$. O composto β -cariofileno não inibiu crescimento celular em nenhuma dose testada, mas o α -humuleno foi citotóxico em 32 e 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$. O interessante deste estudo é que a citotoxicidade dos dois compostos juntos foi mais significativa (75%) que a apresentada pelo α -humuleno sozinho (50%), indicando que o β -cariofileno potencializa o efeito do α -humuleno, o que vem de acordo com estudo de Di Sotto et al., (2010), no qual reporta que o β -cariofileno induz aumento da atividade anticâncer do α -humuleno frente a linhagens tumorais.

Fontes et al.(2013) estudaram a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial das folhas de *Guatteria pogonopus* (*Annonaceae*), composto por (E)-cariofileno e β -pirene. A citotoxicidade foi avaliada em células tumorais, OVCAR-8 e PC-3M,

usando ensaio MTT, obtendo valores de IC₅₀ entre 3,8 e 20 µg/mL. Em outro estudo (Loizzo et al., 2007) o (E)-cariofileno apresentou forte citotoxicidade em linhagens de adenocarcinoma renal (ACHN) com valor de IC₅₀ 20 µg/mL, sugerindo que os compostos majoritários são responsáveis pelos efeitos encontrados. De acordo com Di Souto et al., (2010), o efeito anticâncer do β-cariofileno é resultado da capacidade deste induzir detoxificação enzimática.

Park et al. (2011) investigaram a atividade do óxido de β-cariofileno, isolado de óleos essenciais de várias plantas medicinais como a guava (*Psidium guajava*), orégano (*Origanum vulgare* L.) e pimenta preta (*Piper nigrum*). Este composto apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante e antitumoral. Foi verificado se o composto exerce seus efeitos através da modulação da via de sinalização AKT/mTOR/S6K1, utilizando linhagens PC-3 e MCF7. Pode-se concluir que o óxido de β-cariofileno não exerceu efeitos antiproliferativos e apoptóticos mas é capaz de reprimir a ativação desta via e induzir produção de ERO mediado por ativação da MAPKs, nas linhagens tumorais avaliadas. Atuando da mesma forma sobre a mTOR, que está alterada em diversas patologias como câncer (Park et al., 2011).

O óleo essencial de *Commiphora gileadensis*, que tem origem no Egito, apresenta o β-cariofileno como componente principal e responsável pelos efeitos antiproliferativos em linhagem tumoral BS-24-1 (linfoma de rato). Neste estudo de Aimel et al. (2012) descreve-se também a ativação da caspase 3, sugerindo o mecanismo de morte celular por apoptose e a seletividade do composto, que teve efeitos nas células tumorais e não apresentou efeitos nas não tumorais.

Dentro deste contexto, muitos isolados de óleos essenciais de plantas medicinais, têm sido estudados *in vitro* e *in vivo* apresentando capacidade de uso combinado com os quimioterápicos tradicionais, tais como: eugenol, carvacrol, nerolidol, α-humuleno e β-cariofileno entre outros. β-elemene apresentou sinergismo com a doxorrubicina em tumores de pulmão (Liu et al., 2009), β-cariofileno facilita a passagem do paclitaxel através membrana celular das células tumorais (Lesgards et al., 2014).

De acordo com dados da literatura as principais atividades dos compostos majoritários nerolidol, α-humuleno e β-cariofileno descritas são: citotóxicos em diversas linhagens tumorais (MCF7, PC-3, HT29 e HCT116), atividade anti-inflamatória em diversos modelos animais e não mutagênicos em células de mamífero ou bactéria, sendo promissores compostos para investigar potencial antitumoral.

1.3. Câncer e resistência tumoral

1.3.1 Câncer

O câncer é considerado um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo ainda importante causa de morte no Brasil e no mundo, desde 2003. Estimativas prevêem que em 2030, haverá 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

Câncer é a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pela proliferação celular sem limite. As células cancerígenas acumulam alterações estruturais e/ou funcionais nos genes responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação celular, o que ocasiona falhas no mecanismo de controle de crescimento (Alberts et al., 2002). Apesar das origens antigas desse termo serem relativamente incertas, provavelmente deriva do termo em latim caranguejo, presumidamente porque o câncer “agarra-se de uma maneira obstinada a qualquer parte do que se apodera, como um caranguejo” (Kumar et al., 2004).

Os tumores benignos crescem como massas expansivas que permanecem localizadas em seu sítio de origem e não têm a capacidade de se infiltrar, invadir ou metastizar para outros locais, como os tumores malignos. As metástases são implantes tumorais separados do tumor primário. A metástase caracteriza de modo inequívoco um tumor como sendo maligno. A invasibilidade dos tumores possibilita sua penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, criando a oportunidade para uma disseminação. Com poucas exceções, todos os cânceres podem metastizar. Em geral, quanto mais agressivo, de crescimento mais rápido e maior o tumor primário, maior é probabilidade de metástases (Bogner et al., 2010).

As células eucarióticas passam por uma série de eventos que constituem o ciclo celular, o qual as células duplicam seu DNA e posteriormente, entram em divisão (mitose). As células neo-formadas podem continuar a se dividir, ou parar seu ciclo celular, entrando no estado de quiescência. A regulação do ciclo celular é crítica para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares (Lodish et al., 2002).

Segundo a oncologia molecular, o câncer é o resultado final de um acúmulo de alterações genéticas, algumas das quais podem ser adquiridas e outras herdadas. Os genes que são alterados são aqueles envolvidos nos processos celulares normais e fundamentais, como regulação do ciclo celular, a sinalização, e a diferenciação (Pelúzio et al., 2006). Estes genes mutados podem ser divididos em três grupos: oncogenes, proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Oncogenes são genes cuja presença e/ou hiperatividade podem predispor ao desenvolvimento de câncer. Codificam proteínas que estimulam excessivamente a proliferação celular. O oncogene c-myc tem sido apontado como peça central no processo tumorigênico em diversos cânceres humanos. A proteína codificada pelo gene c-myc, atua inativando os supressores tumorais, embora algumas vias associada a esta proteína não tenham sido totalmente elucidadas. A atividade do c-myc em células normais é regulada por sinais externos, como fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular. Células diferenciadas normalmente expressam baixos níveis de c-myc (Duarte, 2010).

Os proto-oncogenes são uma família de genes normais que codificam as proteínas envolvidas no controle do ciclo celular. Por fim, genes supressores tumorais, são genes que codificam proteínas que inibem o crescimento de células tumorais. O principal e mais estudado gene supressor tumoral é o p53, denominado “guardião do genoma”, o qual codifica um fator de transcrição protéico que se acumula quando ocorre dano ao DNA ativando a transcrição de vários genes, um dos quais codifica a proteína p21. A proteína p21 inativa complexos de ciclinas/CDKs, impedindo, assim, a fosforilação da proteína Rb (a qual em células quiescentes encontra-se hipofosforilada), com conseqüente interrupção do ciclo no ponto de controle 1, permitindo assim a ocorrência do reparo do DNA. Caso o reparo não seja bem-sucedido, o gene p53 desencadeia um processo de morte celular programada chamada apoptose. Sendo assim, anormalidades na expressão do p53 estão associadas ao desenvolvimento de tumores malignos (Rang et al., 2004; Parisotto, 2011).

O controle do ciclo celular, denominado *checkpoint* (ponto de controle), representa um mecanismo de vigilância cujo papel principal é o de evitar o acúmulo de erros genéticos durante as divisões celulares, dessa forma protegendo a integridade genômica das células. Para garantir a fidelidade da duplicação, os *checkpoints* desempenham as seguintes tarefas: induzem um retardo no ciclo celular; ajudam a ativar o reparo do DNA; bloqueiam o ciclo celular até que o reparo seja feito com sucesso e reiniciam a progressão do ciclo. Os principais componentes desse sistema de controle são duas famílias de

proteínas: as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDKs). As CDKs fosforilam diversas proteínas ativando umas e inibindo outras para coordenar suas atividades. Cada CDK é inativa até que se ligue a uma ciclina, e esta ligação faz com que a CDK passe a fosforilar as proteínas (mais especificamente nos resíduos de serina e treonina) necessárias para determinada etapa do ciclo celular (Rang et al, 2003). A atividade das CDKs é também regulada pelos *checkpoints*, sendo assim mutações ou falhas nos mecanismos desse controle do ciclo celular podem implicar na desregulação da atividade das CDKs, aumentando a probabilidade de desenvolvimento das transformações malignas (Malumbres e Barbacid 2009).

Múltiplos sinais modulam a proliferação celular, sobrevivência e morte celular e essa ação coordenada permite que a célula normal cresça e se divida até sua senescência. Entretanto as células tumorais perdem capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole de proliferação e ausência de morte celular, contribuindo para o desenvolvimento dos tumores. De modo geral, estímulos tóxicos ou deletérios a célula podem desencadear a morte celular por necrose ou apoptose, as quais são diferenciadas pela morfologia e vias bioquímicas celulares (Kalimuth e Kim Se-Kna, 2013).

Segundo Cairrão e Domingos (2010), a morte celular pode ser classificada em três tipos: morte celular programada, apoptose e necrose. A apoptose é um processo celular complexo, que desencadeia autodestruição individual. Pode ser desencadeada por estímulos externos através de receptores de superfície ou por estímulos internos de estresse intracelular ou nas vias metabólicas. Essas vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, as quais exercem papel central no processo de morte celular. O processo de apoptose pode ser dividido em uma fase de ativação, na qual as caspases se tornam cataliticamente ativas, e uma fase de execução, na qual as enzimas atuam provocando a morte celular. As caspases podem desencadear o processo apoptótico por duas vias: via extrínseca (via receptor) ou via intrínseca (via mitocondrial). A via extrínseca pode ser ativada por receptores de morte que contém um domínio citoplasmático, envolvido nas interações proteína-proteína (os receptores mais conhecidos são CD95 e Fas). Quando o receptor de morte é conectado com seu ligante, é ativado e se liga a proteína adaptadora, a qual também contém um domínio de morte, chamado de FAAD (*Fas-associated death domain*). Uma vez ligado ao receptor de morte, a proteína adaptadora se liga a uma forma inativa da caspase-8, ativando-a. A caspase-8 ativada desencadeia uma cascata de ativação de outras caspases, chamadas caspases efetoras,

como a caspase-3. Essa via da apoptose pode ser inibida por uma proteína chamada FLIP, a qual se liga a pró-caspase 8 mas não consegue clivar nem ativar a enzima pois não tem atividade catalítica. Na via mitocondrial resulta do aumento da permeabilidade mitocondrial e da liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma, sem a participação dos receptores de morte (Rang et al., 2003; Kumar et al., 2004). Uma dessas proteínas liberadas pela mitocôndria é a citocromo c, a qual se liga a uma proteína chamada Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*) e esse complexo ativa a caspase-9. O resultado final é a ativação da caspase-3, que induz a clivagem de ligações peptídicas em substratos importantes tais como: proteína quinase, proteína do citoesqueleto, proteínas relacionadas com o reparo do DNA, subunidades inibitórias de endonucleases, levando à destruição das funções celulares vitais, acarretando consequentemente ao aparecimento das modificações morfológicas características nas células em processo apoptótico, tais como: contração do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos (Parisotto, 2011; Amiel et al., 2012).

A necrose é definida como uma forma violenta de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia, difere de apoptose por representar um processo passivo onde a morte celular se processa por um dano direto, de todas as estruturas celulares. É um fenômeno degenerativo, irreversível causado por agressão intensa onde ocorre uma degradação progressiva das estruturas celulares. Há alteração na permeabilidade da membrana, por diminuição nos níveis de ATP, que tem como consequência comprometimento da bomba de Na^+/K^+ e de outros fenômenos que são ATP-dependentes. Resultando em rompimento de organelas e membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória (Duarte, 2010).

As quimioterapias convencionais causam intensos efeitos colaterais, com taxa de sucesso limitada devido à concentração insuficiente da droga, alta toxicidade sistêmica, ausência de seletividade, além de colaborarem para resistência desses tumores após tratamento prolongado. Estas drogas são citotóxicas, pró-apoptóticas e não seletivas, sendo tóxicas para as células normais e levando o paciente às inúmeras reações adversas. Acredita-se que diversas substâncias apresentem potencial valor na prevenção ao câncer ou atuem como agentes terapêuticos, sendo assim, muitos estudos desenvolvem uma relação entre substâncias naturais e determinados cânceres, a fim de identificar um

agente potencialmente anticancerígeno, porém mais seletivo (Lesgards et al., 2014; Boire et al., 2013).

Diversos processos bioquímicos têm sido propostos para explicar o efeito antitumoral dos óleos essenciais e seus compostos bioativos: diminuição da inflamação e estresse oxidativo; produção de ERO na célula tumoral sem causar este mesmo efeito na célula não tumoral; alteração sobre a polarização da membrana mitocondrial; ativação das caspases, inativação da via PI3K/Akt/NF- κ B entre outros. Muitos autores sugerem que os terpenos têm grande potencial para constituir uma nova classe de agentes anticancer (revisado por Lesgards et al., 2014).

Existem vários fármacos já consagrados na terapia do câncer, porém nenhuma das estratégias terapêuticas atuais é capaz de regredir completamente as manifestações dessa patologia. Além disso, os tratamentos atuais têm como principal obstáculo o desenvolvimento de resistência celular aos fármacos (MDR= *multidrug resistance* ou resistência multifármaco), o qual se caracteriza pela capacidade das células neoplásicas de desenvolverem resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos, estruturalmente e funcionalmente não relacionados (Goodman & Gilman, 2001; Almeida et al., 2005).

Os principais alvos moleculares dos vários fármacos utilizados na quimioterapia do câncer atualmente incluem: os antimetabólitos, os quais inibem a síntese de purinas (ex: metotrexato, tioguanina); agentes que inibem a formação de desoxirribonucleotídeos (ex: hidroxiuréia, fluoruracila); agentes que modificam o DNA por alquilação (cisplatina); agentes que interagem com a topoisomerase II (ex: bleomicina, doxorubicina, daunorubicina); agentes inibidores da síntese de RNA ou proteínas (ex: actinomicina D, vincristina) (Rang et al., 2003;). Dentre esses grupos, os antibióticos antineoplásicos estão entre os mais importantes agentes utilizados na quimioterapia do câncer, incluindo aqui os membros das famílias da antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácido aureólico. Entre aqueles clinicamente mais utilizados, encontram-se os derivados da daunomicina, particularmente doxorubicina/ idarrubicina e mitomicina C (Cragg; Newman, 1999). A grande maioria desses antibióticos utilizados exerce sua atividade antineoplásica por inibição da topoisomerase II, grupo de enzimas que catalisam o relaxamento da super-hélice do DNA em seu processo de replicação e síntese de novo.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 20% dos casos novos de câncer em mulheres são

de mama. Para o Brasil, em 2014 foram esperados 57.120 casos novos de câncer de mama com risco estimado de 56,09 casos de câncer em 100 mil mulheres. Esta frequência é aumentada em mulheres das regiões Sudeste, Sul e Centro Oeste. Já o câncer de colorretal é um dos tipos mais frequentes do mundo, especialmente na Europa e América do Norte. A estimativa para 2014 foi de 15.070 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 17.530 em mulheres. Segundo estimativa mundial esse tipo de câncer configura-se como o terceiro tipo mais comum entre os homens (INCA, 2014).

A resistência tumoral é atualmente um dos maiores empecilhos para eficiência da quimioterapia no tratamento de determinados tumores, através dela as células cancerosas desenvolvem mecanismos que impedem a ação dos agentes antitumorais resultando no insucesso do tratamento (Huber et al., 2010). São reconhecidos dois tipos de resistência: a intrínseca, quando não há resposta mesmo no primeiro ciclo do tratamento, e a adquirida, quando surge no segundo ciclo (pós-terapia). A resistência a múltiplas drogas (MDR, “Multidrug Resistance” ou resistência multifarmaco) a qual se caracteriza pela capacidade das células neoplásicas de desenvolverem resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos, estruturalmente e funcionalmente não relacionados (Almeida et al., 2005), é um caso de resistência adquirida, observada em células tumorais, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos.

Os mecanismos celulares de resistência incluem a redução do acúmulo de drogas quimioterápicas nas células neoplásicas, mediada por várias proteínas de membrana, as quais pertencem à família das proteínas transportadoras ABC (ATP Binding Cassete), dentre os 49 genes da família de transportadores ABC, identificados no genoma apenas 15 são descritos como transportadores de quimioterápicos em sistemas *in vitro* dentre estes apenas 3 estão envolvidos diretamente na resistência e apresentam forte relevância clínica pois estão super expressas em diversos tumores. Entre estas proteínas podem ser incluídas a glicoproteína P (PGP) e a proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP) (Vecchio et al., 2006). O ABC é frequentemente associado com a diminuição do acúmulo celular de quimioterápicos hidrofóbicos, expulsando-os ativamente das células quando estas drogas estabelecem um gradiente de concentração. Através da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) se obtém energia para que os transportadores possam agir como bombas de efluxo, removendo vários tipos de quimioterápicos intracelulares, sendo este um dos mecanismos predominantes de ação do MDR (Yuan et al., 2008; Liu, 2009).

Muitos medicamentos quimioterápicos podem induzir danos ao DNA diretamente (por exemplo, medicamentos à base de platina) ou indiretamente (por exemplo, inibidores de topoisomerase). A resposta celular aos danos é a reparação ou morte celular; por conseguinte, a capacidade de reparo nas células cancerosas tem grande influência sobre a eficácia de drogas que danificam o DNA. Os danos no DNA induzem a parada do ciclo celular, que evoluiu para permitir que as células tenham tempo para fazer o reparo. Em alguns tipos de câncer, a regulação do ciclo celular é interrompido em função de alterações ou perda de função dos genes supressores de tumor. Por exemplo, a mutação de p53, que possui um papel importante na regulação do ciclo celular, também está envolvida na indução de apoptose e sua mutação é frequentemente associada com a resistência a drogas (Holohan et al., 2013). Dependendo do contexto os sistemas de reparo de DNA podem ser considerados inimigos ou aliados das células neoplásicas, a inativação de determinadas proteínas de reparo pode facilitar o acúmulo de mutações e assim garantir a variabilidade necessária para o desenvolvimento das características cancerígenas (Sousa, 2012).

Outro mecanismo de resistência fundamental é a desregulação da apoptose. Grande parte dos fármacos antineoplásicos exercem seus efeitos citotóxicos por meio da indução seletiva de apoptose levando à morte as células malignas, considerando que a resistência a apoptose é uma marca registrada destas células. Entre as proteínas inibidoras de apoptose encontra-se os membros da família BCL-2, o papel destes na regulação a resposta a quimioterapia tem sido extensamente estudado, visto que mutações ou superexpressão dos genes que codificam essas proteínas são associado a várias malignidades e resistência a diversas terapias. Então, os fatores que podem desencadear a apoptose são: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos ao DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (Luqmani, 2005; Holohan et al., 2013).

Novas abordagens para superar o MDR incluem a análise de novos agentes químicos com melhores propriedades farmacológicas. Além dos compostos de síntese química, produtos naturais proporcionam uma rica fonte de alvos que possam ser específicos para a inibição do crescimento de células cancerosas, abrindo oportunidades para encontrar novos agentes anticâncer com melhores características de ação (Sertel et al., 2010).