

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER *IN VITRO* DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO GÊNERO *Eugenia*

ELENN SUZANY PEREIRA ARANHA

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ELENN SUZANY PEREIRA ARANHA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER *IN VITRO* DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO GÊNERO *Eugenia*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências farmacêuticas, área de concentração bioanálises e desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

Orientadora: Prof^ª Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

MANAUS

2014

ELENN SUZANY PEREIRA ARANHA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER *IN VITRO* DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO GÊNERO *Eugenia*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências farmacêuticas, área de concentração bioanálises e desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Orientadora

Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Membro

Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque
Membro

Aos meus pais, Sérgio e Elenilda.

Simplesmente por amar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, simplesmente! A Ele, Tudo!

Aos meus pais, Elenilda e Sérgio, por seu infinito amor. Mesmo distante, pude sentir a cada dia o amor e como ele cresceu. E ao meu irmão, pelo incentivo e carinho.

A minha mãe Manauara, Marias das Graças Menezes, por todos os conselhos, palavras de incentivo, cuidados. Por tudo!

A minha prima, Lilia Gabriela, por todo o carinho e preocupação, e principalmente porque através dela tive um lar e uma família em Manaus.

A minha orientadora, Marne Carvalho de Vasconcellos, pela confiança, incentivo, conversas, os risos, as broncas (que me fizeram sorrir e chorar), mas que me fizeram chegar até o fim.

Ao professor Emerson, pelos ensinamentos no ambiente de laboratório e pela confiança.

Aos meus colegas de laboratório, que com o passar do tempo se tornaram amigos: Ana Ralph, Rafaella, Fernanda Gomes, Patrícia Daniele, Zalina Rodrigues, Leilane, Márcia, Josélia, Gilderlane, Gleyce e Igor. Foi muito bom cada minuto que passei com eles.

A Ana Boletti, pela paciência durante o treinamento, quando ganhei primeira garrafinha de células.

Aos farmacêuticos, Fernanda, Ana Ralph, Rodrigo, Lucileno, Patrícia por todas as dúvidas tiradas, principalmente em cálculos de concentração e diluição de drogas. Nossa muito obrigada!

Ao Lucileno, pelos animais cedidos, estruturas químicas lindas, conversas e companhia até o ponto de ônibus.

A Leilane, pela companhia e ajuda no ensaio do cometa. Fundamental!

As minhas amigas de Santarém, por escutar minhas reclamações, principalmente Nayana Yared, companhia de todas as horas pra tudo.

Ao Laboratório de abertura de amostras (Central Analítica da UFAM) pelos óleos essenciais cedidos. E ao Centro Biotecnológico da Amazônia (CBA) pela análise cromatográfica dos óleos essenciais.

Ao Sidney Azevedo, pela obtenção e auxílio na análise cromatográfica dos óleos essenciais. Além das conversas e almoços. Foi tudo ótimo!

Aos seguranças, Sr. Vitor e Heuton, sempre gentis, atenciosos e preocupados com nosso bem estar.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muitíssimo OBRIGADA!!

RESUMO

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo. A pesquisa de produtos naturais constitui uma estratégia para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos. Objetivou-se nessa pesquisa identificar os componentes químicos, investigar o potencial anticâncer *in vitro* e a genotoxicidade de óleos essenciais do gênero *Eugenia*. Para isso, foram utilizados os ensaios de citotoxicidade do alamar blue e o potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos, como triagem inicial para a seleção das amostras com potencial citotóxico, a partir da determinação da CI_{50} das amostras. Posteriormente a seleção das amostras, buscou-se avaliar o efeito anticâncer dos óleos essenciais e a sua genotoxicidade. Foram testados nove óleos essenciais, em concentração única (50 $\mu\text{g/mL}$) dos quais apenas dois - *Eugenia cuspidifolia* (1) e *Eugenia tapacumensis* (3)- foram selecionados para os testes posteriores. A CI_{50} , em 72 horas, obtida para essas duas amostras variou entre 4,69 a 24,35 $\mu\text{g/mL}$ e 6,22 a 26,17 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, entre as linhagens tumorais. Para a linhagem não tumoral, em 72 horas, os valores de CI_{50} foram de 25,51 $\mu\text{g/mL}$ para *E. cuspidifolia* (1) e 36,12 $\mu\text{g/mL}$ para *E. tapacumensis* (3), além de não causarem hemólise a eritrócitos de camundongos. As espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) foram mais ativas para as linhagens de colorretal (HCT 116) e ovário (ES-2), e escolheu-se para os testes posteriores utilizar a linhagem HCT 116, por ser um dos tipos de câncer mais frequentes em diagnósticos e também em mortes a nível mundial. A constituição química dos óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) foi investigada através de cromatografia gasosa. Foram identificados um total de 26 constituintes para as duas amostras. Os componentes majoritários foram óxido de cariofileno, α -copaeno, hepóxido de humuleno II e cis-nerolidol. Os óleos nas concentrações de 7,5, 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$, foram testados no ensaio clonogênico e reduziram significativamente o número de colônias ($p < 0,05$) na concentração de 7,5 e 15 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado ao controle DMSO (0,2%). No ensaio de motilidade celular, nos tempos de 24 e 48 horas, os óleos essenciais reduziram a migração ($p < 0,05$) somente na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, no tempo de 48h. O potencial inibidor de metaloproteinasas MMP-9 e MMP-2 foi avaliado através de método zimográfico. Nos resultados obtidos, o melhor efeito inibitório foi do óleo essencial de *E. tapacumensis* (3), o qual reduziu a atividade enzimática ($p < 0,05$) nas concentrações de 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$, nos dois tempos de tratamento (24 e 48h). A genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do cometa, usando duas versões, a de pH alcalino, o qual detecta qualquer dano causado ao DNA, e a de pH neutro, específico para quebras da fita dupla de DNA. Através da análise do Índice de dano, os resultados no ensaio em pH alcalino foram semelhantes ao do pH neutro. Somente *E. tapacumensis* (3) (30 $\mu\text{g/mL}$) causou dano ao DNA ($p < 0,05$) na versão alcalina. Na versão em pH neutro todas as concentrações causaram dano ($p < 0,05$). Assim, conclui-se que os óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) são citotóxicos nas linhagens tumorais, tem potencial anticâncer na linhagem HCT116 agindo como citotóxico e citostático dependendo do tempo e da concentração testada e somente a *E. tapacumensis* (3) é genotóxica, em células não neoplásicas, , entretanto estudos mais específicos precisam determinar se essa genotoxicidade é reversível ou se o mecanismo de ação citotóxica do óleo está relacionada a lesão do DNA das células.

Palavras-chave: *E. cuspidifolia*, *E. tapacumensis*, citotoxicidade, colorretal, HCT 116, genotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is one of the most causes of death in the world. The research of natural products is strategy to develop anticancer agents. The aim this research was to identify chemical components, to investigate the anticancer potential *in vitro* and genotoxicity of *Eugenia* genus's essential oil. For this, were used the cytotoxicity assay of Alamar blue and the hemolytic potential in erythrocytes of mice, as initial screening for selection of samples with cytotoxic potential, from the determination of the samples IC₅₀. After the samples selection, we attempted to evaluate anticancer effect of the essential oil and its genotoxicity. Nine essential oils were tested, in a single concentration (50 µg/mL) which only two- *Eugenia cuspidifolia* (1) e *Eugenia tapacumensis* (3)- were selected for later tests. The IC₅₀, in 72 hours, obtained to these samples varied between 4,69 to 24,35 µg/mL and 6,22 to 26,17 µg/mL, respectively, among tumor cell lines. For non-tumor cell line, in 72 hours, the values for the IC₅₀ were 25,51 µg/mL to *E. cuspidifolia* and 36,12 µg/mL to *E. tapacumensis* besides they didn't cause hemolysis to mice erythrocytes. The species *E. cuspidifolia* and *E. tapacumensis* were more active to colorectal line (HCT 116) and ovary (ES-2), and the HCT 116 line was chosen to be used for later tests, because it's one of the most frequent kind of cancer in diagnostics and in deaths worldwide at a world level . The chemical constitution of *E. cuspidifolia* and *E. tapacumensis* essential oils was investigated through gas chromatography. A total 26 constituents were identified for both samples. The majority components were caryophyllene oxide, α -copaene, hepoxid of humulene II and cis-nerolidol. The essential oils in concentrations 7,5, 15 and 30 µg/mL, were tested in the clonogenic assay and they significantly reduced the number of colonies ($p < 0,05$), in the 7,5 and 15 µg/mL concentrations, when compared with DMSO (0,2%). In the wound-healing assay, 24 and 48 hours, the essential oils reduced the migration *in vitro* ($p < 0,05$) only on the concentration 30 µg/mL, at 48h. The inhibitor potential of metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 was evaluated through of zymography method. In the results, the better inhibition effect was from the *E. tapacumensis* essential oil, that reduced the enzymatic activity ($p < 0,05$) in the concentrations 15 and 30 µg/mL, in both treatments times (24 and 48h). Genotoxicity was evaluated by comet assay, using two versions, alkaline pH, which detects any damage caused to DNA, and neutral pH, specific to double-stranded breaks in DNA. Through damage index analysis, the results in alkaline pH assay were similar to the neutral pH. Only *E. tapacumensis* (30 µg/mL) caused damage DNA ($p < 0,05$) in the alkaline version. At the neutral pH version, all concentrations tested ($p < 0,05$) caused DNA damage. Thus, is concluded that *E. cuspidifolia* and *E. tapacumensis* essential oils are cytotoxic in tumor cell lines, and they have anticancer potencial in HCT 116 cell line acting as cytotoxic and cytostatic depending on the time and the tested concentration. Only *E. tapacumensis* is genotoxic, in non-tumor cell line, however more specific studies are needed to determine whether this genotoxicity is reversible or if the mechanism of cytotoxic action of essential oil is related to the cell DNA damage.

Keywords: *E. cuspidifolia*, *E. tapacumensis*, citotoxicity, colorectal, HCT 116, genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Processo de carcinogênese ou oncogênese.....	18
Figura 2- Alterações biológicas do câncer.....	18
Figura 3- Delineamento experimental das atividades desenvolvidas.....	34
Figura 4- Estrutura química dos componentes majoritários dos óleos essenciais obtidos das folhas das espécies <i>E. cuspidifolia</i> e <i>E. tapacumensis</i>	48
Figura 5-Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas da espécie <i>E. cuspidifolia</i>	49
Figura 6-Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas da espécie <i>E. tapacumensis</i>	49
Figura 7- Efeito dos óleos essenciais de <i>E. cuspidifolia</i> e <i>E. tapacumensis</i> no ensaio clonogênico.....	51
Figura 8- Efeito inibitório do óleo essencial de <i>E. cuspidifolia</i> no ensaio de motilidade celular	54
Figura 9- Efeito inibitório do óleo essencial de <i>E. tapacumensis</i> no ensaio de motilidade celular.....	55
Figura 10- Efeito inibidor dos óleos essenciais de <i>E. cuspidifolia</i> e <i>E. tapacumensis</i> na atividade de MMP-2 e MMP-9 em células HT1080	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Efeito dos óleos essenciais de <i>E. cuspidifolia</i> (A) e <i>E. tapacumensis</i> (B) no ensaio clonogênico, após 10 dias de incubação, em concentrações de 7,5, 15 e 30 µg/mL. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA <i>one way</i> seguido de teste Tukey.....	52
Gráfico 2-Efeito dos óleos essenciais de <i>E. cuspidifolia</i> (A) e <i>E. tapacumensis</i> (B) no ensaio de motilidade celular, nas concentrações de 7,5, 15 e 30 µg/mL e tempos de tratamento de 24 e 48h. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA <i>two way</i> seguido de Bonferroni <i>posttest</i>	54
Gráfico 3- Atividade de MMP-2 e MMP-9 em células HT1080, após do tratamento com os óleos essenciais de <i>E. cuspidifolia</i> e <i>E. tapacumensis</i> . A- 24h de tratamento; B- 48h de tratamento; ST- Sem tratamento. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA <i>two way</i> seguido de Bonferroni <i>posttest</i>	57
Gráfico 4- Índice de dano ao DNA em células MRC-5, após 3h de tratamento com os óleos essenciais de <i>E. cuspidifolia</i> e <i>E. tapacumensis</i> . A- Cometa alcalino; B- Cometa neutro. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA <i>one way</i> seguido de teste Tukey.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Estimativa do número de casos novos de câncer no Brasil em 2014 para homens e mulheres.	16
Tabela 2- Substâncias obtidas de plantas utilizadas na terapia do câncer.	27
Tabela 3- Potencial anticâncer de óleos essenciais em diferentes linhagens de células.....	31
Tabela 4- Efeito dos óleos essenciais de espécies do gênero <i>Eugenia</i> na viabilidade celular de linhagens tumorais e não tumoral (MRC-5) utilizando o ensaio Alamar blue.....	45
Tabela 5- Determinação do potencial hemolítico dos óleos essenciais de espécies de plantas do gênero <i>Eugenia</i> em eritrócitos de camundongos.....	47
Tabela 6- Constituintes químicos dos óleos essenciais obtidos das folhas das espécies <i>E. cuspidifolia</i> e <i>E. tapacumensis</i>	50

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	13
2-REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1-Câncer.....	15
2.2- Produtos naturais.....	20
2.3- Citotoxicidade e triagem de novas drogas.....	24
2.4-Óleo essencial e gênero <i>Eugenia</i>.....	28
3-OBJETIVOS.....	33
3.1-Geral.....	33
3.2-Específicos.....	33
4-MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1-Delineamento experimental.....	34
4.2-Obtenção dos óleos essenciais.....	35
4.3-Linhagens e cultura celular.....	36
4.4-Avaliação da citotoxicidade.....	36
4.4.1- Ensaio Alamar blue.....	36
4.4.2-Avaliação da atividade hemolítica.....	37
4.5- Identificação dos componentes químicos.....	38
4.6-Ensaio clonogênico.....	39
4.7-Ensaio de motilidade celular.....	39

4.8- Determinação da atividade enzimática de MMPs (MMP-2 e MMP-9).....	
4.8.1-Obtenção das proteínas coletadas no meio de cultura.....	40
4.8.2-Mobilidade eletroforética das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina.....	40
4.8.3- Incubação e revelação do gel.....	41
4.9- Avaliação da genotoxicidade	41
4.9.1- Teste do cometa- pH alcalino e neutro.....	41
5- Análise estatística.....	43
5-RESULTADOS.....	44
5.1- Citotoxicidade.....	44
5.1.1- Ensaio Alamar blue.....	44
5.1.2-Avaliação do potencial hemolítico.....	46
5.2- Identificação dos componentes químicos.....	48
5.3- Ensaio clonogênico.....	51
5.4- Ensaio de motilidade celular.....	53
5.5- Determinação da atividade enzimática de MMPs (MMP-2 e MMP-9).....	56
5.6- Avaliação da genotoxicidade.....	58
5.6.1- Ensaio do Cometa – pH alcalino e neutro.....	58
6- DISCUSSÃO.....	61
7- CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

1-INTRODUÇÃO

Câncer é uma doença ocasionada por sucessivas mutações no material genético de células, essas mutações podem levar a desordens nos processos normais de divisão celular provocando um crescimento celular desordenado e descontrolado (REDDY, *et al.*, 2003). É uma doença que provoca muitas mortes pelo mundo. No Brasil, estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2014 preveem aproximadamente 580 mil novos casos de câncer (INCA, 2014a).

O Brasil possui uma rica biodiversidade, sendo considerado o maior país em número de espécies endêmicas. Essa diversidade é uma fonte de substâncias que podem possuir atividades biológicas significativas, com ação terapêutica contra doenças, ou servir de protótipos para a síntese de novas substâncias, as quais podem ser úteis no desenvolvimento de novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009). As espécies vegetais são uma fonte importante de substâncias bioativas, principalmente devido à diversidade estrutural de seus metabólitos (BRANDÃO, *et al.*, 2010).

A busca por agentes citotóxicos mais eficazes continua a ser um ramo importante na pesquisa de produtos naturais, para a descoberta de novas drogas. A diversidade de compostos de origem natural e seu enorme potencial bioativo fizeram com que diversos produtos isolados a partir de plantas, flora e fauna marinhas e microorganismos servissem para aplicações terapêuticas, bem como modelo para o desenvolvimento e melhor potencial farmacológico (NOBILI, *et al.*, 2009).

Produtos naturais derivados de plantas têm ganhado significativo reconhecimento no tratamento clínico de doenças humanas. Muitas pesquisas têm avaliado produtos vegetais como agentes eficazes, uma vez que podem atuar em alvos moleculares e celulares específicos e/ ou múltiplos, isso por causa dos efeitos sinérgicos dos diversos metabólitos

produzidos pela planta (NEERGHEEN, *et al.*, 2010). Óleos essenciais são conhecidos por diferentes efeitos biológicos que apresentam, além da fácil disponibilidade, aroma agradável e baixa toxicidade que os fazem candidatos em potencial para o tratamento de várias doenças, inclusive na terapia anticâncer (KUMAR, *et al.*, 2008).

Além dos possíveis efeitos benéficos, os riscos toxicológicos de produtos naturais precisam ser investigados para garantir o seu uso seguro (SIMÕES, *et al.*, 2007). Os estudos de genotoxicidade são uma ferramenta importante para a avaliação de novas substâncias, isso porque apesar de muitos produtos apresentarem atividade farmacológica comprovada pouco se sabe dos possíveis danos que podem causar ao DNA (VARANDA, 2006).

Assim, é interessante avaliar o potencial terapêutico de produtos naturais, seja para a obtenção de substâncias bioativas, que podem servir de protótipos para a síntese de novas substâncias ou adaptar as estruturas já existentes, com a finalidade de torná-las mais ativas e menos tóxicas (LUNGUINHO, 2012).

As pesquisas envolvendo produtos naturais geram expectativas para a comunidade científica, pois através da identificação de novas substâncias podem ser identificadas futuras terapias importantes para a terapêutica de doenças, inclusive para o câncer, já que os medicamentos existentes atualmente para o tratamento desta doença foram obtidos de produtos naturais ou estes serviram para o seu desenvolvimento. Diante da diversidade do potencial químico e biológico de produtos naturais, incluindo as plantas, buscou-se avaliar a atividade anticâncer de óleos essenciais obtidos de espécies vegetais do gênero *Eugenia*. O presente trabalho pretende contribuir para a pesquisa científica, fornecendo dados que possam identificar um produto natural com atividade antitumoral.

2-REVISÃO DA LITERATURA

2.1-Câncer

O câncer é uma enfermidade provocada por mudanças genômicas, que ao longo do desenvolvimento da doença, provocam alterações biológicas levando a formação de tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As causas que levam ao desenvolvimento da doença são variadas, dentre elas se destacam os fatores ambientais, dieta incorreta, e predisposição genética (REDDY, *et al.*, 2003). Estima-se que de todos os casos do mundo, 80 a 90 % estão associados a fatores ambientais, no entanto, o fator genético exerce um papel importante na oncogênese (INCA, 2014).

A incidência de câncer cresceu 20% na última década no mundo todo e espera-se, para o ano de 2030, 27 milhões de casos novos. Nas Américas, o câncer é uma das principais causas de morte (WHO, 2014). Considera-se que uma em cada quatro mortes ocorrem devido ao câncer, sendo a segunda causa mais comum de morte nos Estados Unidos (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013), onde é esperado para o ano de 2014 um total de 1, 665, 540 novos casos e 585, 720 mortes (American Cancer Society, 2014). De acordo com o INCA e o Ministério da saúde, no ano de 2014, os cânceres mais incidentes na população brasileira neste ano serão pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil); mama (57 mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil). A estimativa de casos novos entre as mulheres é de aproximadamente 274 mil e entre os homens 300 mil (Tabela 1) (INCA, 2014a).

Localização primária	Casos novos		Localização primária	Casos novos
Próstata	68.800		Mama feminino	57.120
Traquéia, Brônquio e Pulmão	16.400		Cólon e Reto	17.530
Cólon e Reto	15.070		Colo do útero	15.590
Estômago	12.870		Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.930
Cavidade oral	11.280		Glândula Tireoide	8.050
Esôfago	8.010		Estômago	7.520
Laringe	6.870		Corpo do útero	5.900
Bexiga	6.750		Ovário	5.680
Leucemias	5.050		Linfoma não-Hodgkin	4.850
Sistema Nervoso Central	4.960		Leucemias	4.320
Linfoma não-Hodgkin	4.940		Sistema Nervoso Central	4.130
Pele melanoma	2.960		Cavidade oral	4.010
Linfoma de Hodgkin	1.300		Pele melanoma	2.930
Glândula Tireóide	1.150		Esôfago	2.770
			Bexiga	2.190
			Linfoma de Hodgkin	880
			Laringe	770
Todas as neoplasias sem pele	203.930		Todas as neoplasias sem pele	190.520
Todas as neoplasias	302.350	Todas as neoplasias	274.230	

Tabela 1- Estimativa do número de casos novos de câncer no Brasil em 2014 para homens e mulheres.

FONTE: Adaptado de INCA- Estimativas 2014.

O início do desenvolvimento do câncer está relacionado à manutenção dos sinais proliferativos, uma das principais características das células neoplásicas. Tecidos normais regulam a produção e liberação de sinais que promovem a proliferação celular, e assim garantem a homeostase do número de células, bem como de suas funções. Estes processos estão desregulados nas células neoplásicas, que passam a se dividir de forma descontrolada (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Alterações epigenéticas- mudanças na expressão de genes sem alterar a sequência de nucleotídeos do ácido desoxirribonucleico (DNA) - podem afetar várias características da célula tumoral durante a progressão do câncer até a sua malignidade. Estímulos ambientais e alterações intrínsecas nas células tumorais contribuem para essas mudanças epigenéticas, induzindo adaptações da célula cancerosa e a consequente progressão do câncer (TADDEI, *et al.*, 2013).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese (Figura 1), o qual é provocado por mutações e alterações genéticas em genes específicos o que levam a ativação de oncogenes- estimulam a proliferação celular- e inativação de genes supressores de tumor- que controlam processos de morte celular e controle do ciclo celular normal (HANAHAN; WEINBERG, 2011; WANG, *et al.*, 2012). Em geral, a carcinogênese ocorre lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo é composto por três estágios: o estágio de iniciação, promoção e progressão (BRASIL, 2011).

No estágio de iniciação, as células sofrem ação dos agentes cancerígenos, que modificam alguns dos seus genes, podendo haver alguma susceptibilidade genética. As células encontram-se geneticamente alteradas, mas ainda não há presença clínica de um tumor. No estágio de promoção, os agentes denominados oncopromotores atuam nas células geneticamente alteradas, as quais são transformadas em células malignas, de forma lenta e gradual. É necessário o contato longo e contínuo com o agente oncopromotor para que ocorra essa transformação, no caso de suspensão do contato, muitas vezes cessa o processo neste estágio. O último estágio é o de progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível das células. Ao longo do tempo, ocorre a instalação do câncer e o mesmo evolui até o surgimento das manifestações clínicas da doença (BRASIL, 2011; REDDY, *et al.*, 2003).

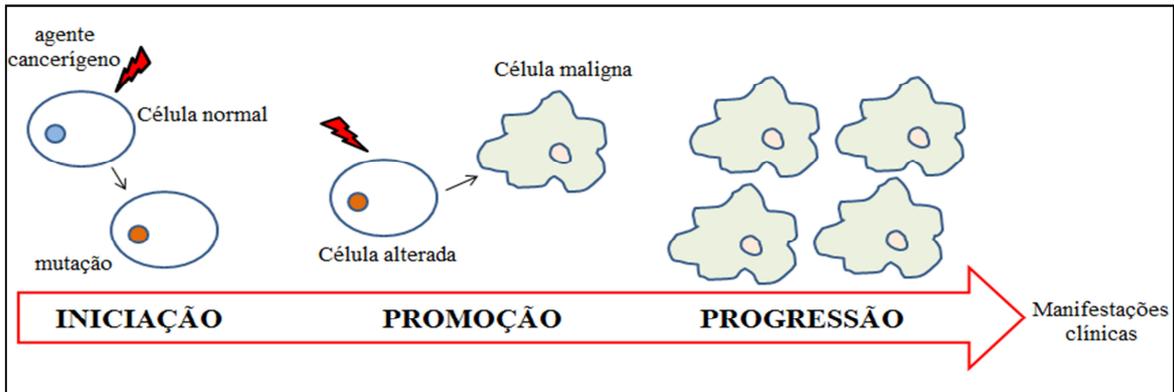


Figura 1- Processo de carcinogênese ou oncogênese.

FONTE: Adaptado de BRASIL, 2011.

Algumas alterações biológicas (Figura 2) são fundamentais para o desenvolvimento da proliferação celular maligna, como: manutenção dos sinais proliferativos, insensibilidade aos sinais anti-proliferativos, resistência a morte celular, capacidade replicativa imortal, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

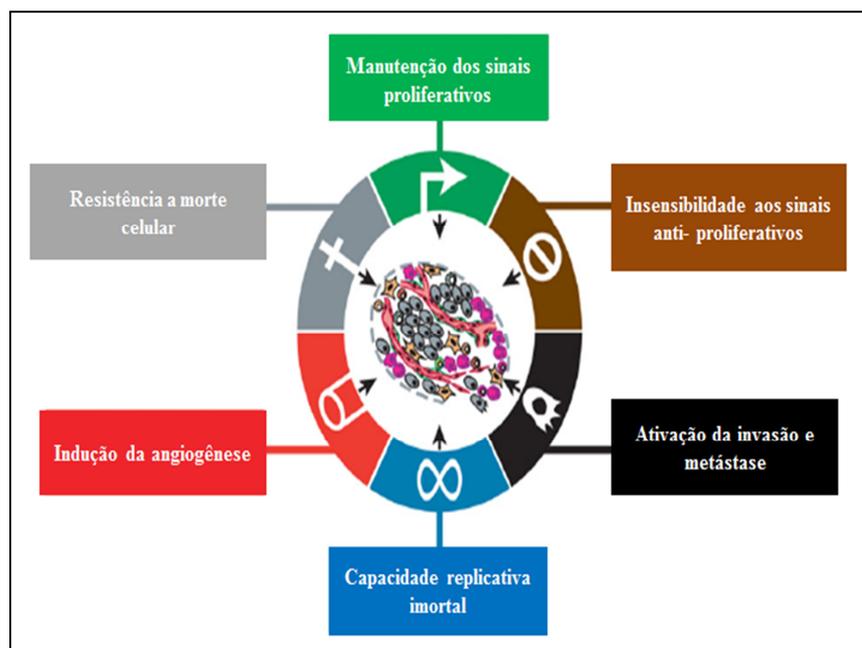


Figura 2- Alterações biológicas do câncer.

FONTE: Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Durante o desenvolvimento de muitos tipos de câncer, a massa de tumor primária gera células que se movem para fora do tumor, invadem tecidos adjacentes e assim deslocam-se para locais distantes onde então podem formar novas colônias. Esse processo é conhecido como metástase, é considerada a causa da malignidade atribuída ao câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

As metástases ocorrem durante a progressão tumoral, onde algumas células neoplásicas perdem a sua adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem através da produção de enzimas proteolíticas, passam pelos vasos sanguíneos e chegam até a circulação podendo, assim, começar a proliferação em outro tecido (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010). Esse processo de invasão e metástase permite que as células escapem da massa de tumor primária e forme colônias em outros lugares do corpo onde, pelo menos inicialmente, fatores como nutrientes e espaço não são limitantes à proliferação celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Os processos de invasão tumoral e metástase estão associados ao aumento da expressão e atividade de metaloproteinases (MMPs). As MMPs são endopeptidases zinco-dependentes capazes de degradar a matriz extracelular e a membrana basal de tecidos. Essas enzimas estão associadas a vários processos fisiológicos como morfogênese, angiogênese e reparo tecidual. No entanto, as MMPs estão envolvidas em diferentes processos patológicos, como artrite, inflamação e o câncer (KUPAI, *et al.*, 2010).

Dentre as MMPs humanas, MMP-2 e MMP-9 (gelatinases), são as principais enzimas expressas em tumores malignos, contribuindo para a invasão tumoral e metástase, ou seja, o desenvolvimento maligno da doença e o grande número de mortes de pacientes diagnosticados com câncer (BLÀZQUEZ, *et al.*, 2008; HWANG, *et al.*, 2010).

As MMPs, por sua capacidade proteolítica, reorganizam as barreiras teciduais facilitando a migração de células tumorais, e contribuindo para o processo de metástase

(LUKASZEWICZ-ZAJAC; MROCZKO; SZMITKOWSKI, 2011). MMP-2 promove a clivagem de proteínas da matriz extracelular, enquanto a MMP-9 modula a permeabilidade do endotélio vascular (GALIS, *et al.*, 1994). A inibição dessas enzimas pode ser considerada como uma estratégia terapêutica no combate do câncer (LEVICAR; NUTTALL; LAH, 2003).

É importante conhecer a biologia dos tumores a partir do “microambiente” que os envolvem e a contribuição para o desenvolvimento do câncer, pois esse aglomerado celular é mais do que uma massa de proliferação de células neoplásicas, é considerado um tecido complexo formado por diferentes tipos celulares, os quais interagem entre si e com o estroma o que contribui para a progressão do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As pesquisas que buscam compreender as alterações moleculares que fundamentam o desenvolvimento do câncer fornecem perspectivas de poder atingir alvos específicos que possam levar a terapias mais eficazes e racionais do câncer (NEERGHEEN, *et al.*, 2010).

A quimioterapia e a radioterapia são os recursos utilizados no tratamento do câncer, juntamente com procedimentos cirúrgicos. Em muitos dos casos, é necessário combinar mais de uma técnica (INCA, 2014b). A tendência, no universo científico, é descobrir novas substâncias de origem natural, que possuam outros mecanismos de ação e possam servir de inspiração no desenvolvimento de novas e futuras drogas anticâncer (KHAZIR, *et al.*, 2014; WANG, W. *et al.*, 2012)

2.2- Produtos naturais

Os produtos naturais têm um papel importante em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças, e várias pesquisas buscam avaliar as propriedades terapêuticas destes

metabólitos (VALENTE, *et al.*, 2013). A natureza é uma fonte interessante para a descoberta de novas substâncias de interesse terapêutico, com uma enorme diversidade química que é encontrada em milhões de espécies de plantas, animais, organismos marinhos e microorganismos (DA ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001). As plantas representam as maiores fontes de substâncias biologicamente ativas que podem ser empregadas para fins terapêuticos, devido à diversidade estrutural de metabólitos produzidos (BRANDÃO, *et al.*, 2010).

O Brasil, além de ser um país rico em sua biodiversidade vegetal, possui um enorme conhecimento que é acumulado pela população local que faz uso dos recursos da natureza para o tratamento de doenças (MONTANARI; BOLZANI, 2001). A biodiversidade de plantas brasileiras representa um grande potencial, oferecendo possibilidades de encontrar novas substâncias para aplicação no tratamento de doenças humanas (BALBANI; SILVA; MONTOVAN, 2009).

Compostos fitoquímicos têm se tornado importantes para a terapêutica de muitas doenças humanas. É importante salientar o uso do produto total obtido de plantas, como extratos, principalmente pelos efeitos sinérgicos que a mistura de metabólitos de uma planta pode apresentar e os múltiplos pontos de intervenção em que estes podem ter efeito (NEERGHEEN, *et al.*, 2010).

Extratos de plantas têm sido usados para prevenir, controlar ou reverter processos moleculares e celulares da carcinogênese devido a múltiplas estratégias de intervenção. Geralmente os mecanismos ocorrem desde a inibição da proliferação celular até a proteção de vias de sinalização celular e apoptose. Desse modo, destaca-se a importância de produtos naturais, para uma possível intervenção no processo carcinogênico, principalmente aqueles derivados de plantas (NEERGHEEN, *et al.*, 2010).

Produtos obtidos de plantas possuem uma longa história de uso no tratamento do câncer, inclusive no desenvolvimento de diversos medicamentos antineoplásicos de uso clínico. Além disso, a compreensão adequada das possíveis interações sinérgicas existentes entre os vários constituintes químicos que uma planta pode possuir pode ser fundamental para a criação de drogas inovadoras e seguras, e que futuramente podem vir a ser aplicada na terapêutica de doenças, inclusive o câncer. Os compostos derivados de plantas podem não servir diretamente como drogas, mas fornecer informações para o seu desenvolvimento (KHAZIR, *et al.*, 2014).

As pesquisas por novas opções terapêuticas para o câncer são de alto interesse, seja para empresas farmacêuticas ou para toda a comunidade científica, principalmente aquelas que busquem minimizar os efeitos secundários tóxicos. O grande desafio da terapêutica do câncer é o desenvolvimento de drogas seletivas, que possam atuar em células de tumores malignos, sem afetar as células não tumorais. A recente abordagem prática para este problema está no uso de plantas como uma fonte para o desenvolvimento de drogas. Desse modo, com a investigação química espera-se obter compostos bioativos com potencial para várias doenças e que sejam tão eficazes quanto aqueles compostos obtidos por síntese (KHAZIR, *et al.*, 2014).

Por outro lado, mesmo com a importante seleção de espécies vegetais com ação terapêutica, muitas têm sido descartadas por sua ação tóxica (VANDEBROEK, *et al.*, 2004). Espécies de plantas produzem compostos químicos tóxicos, que aparentemente servem como defesa contra bactérias, fungos, insetos e predadores (MAISTROA; CARVALHOA; MANTOVANIB, 2004).

A identificação de uma possível atividade toxicológica de substâncias bioativas obtidas de plantas, por meio de testes pré-clínicos, deve preceder seu uso como uma ação preventiva de saúde (ALMEIDA, *et al.*, 2012). É necessário esclarecer os mecanismos e as

condições que mediaram o efeito biológico, antes que as plantas, ou substâncias obtidas destas, sejam consideradas como agentes terapêuticos (VARANDA, 2006).

A sociedade criou ao longo dos anos a percepção de que produtos naturais, principalmente aqueles obtidos de plantas, são seguros e desprovidos de efeitos colaterais. Esse pensamento vem sendo cultivado pelo uso prolongado destes produtos pela população. No entanto, mesmo com finalidades terapêuticas, estes podem apresentar efeitos tóxicos, os quais podem não ser somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados a sua ingestão, mas que podem apresentar toxicidade a longo prazo e de forma assintomática (SIMÕES, *et al.*, 2007).

Alguns produtos naturais com ação terapêutica e também tóxica são tomados sem a devida preocupação quanto aos riscos, pois dependendo da dose esses podem ser benéficos ou tóxicos para o organismo. Avaliar o potencial genotóxico de plantas é de fundamental importância, pois danos ao material genético podem levar a mutações críticas, e, portanto, aumentar o risco de doenças, como o câncer (DEMMA, *et al.*, 2009).

A pesquisa dos possíveis efeitos genotóxicos de um produto natural, ajudam a garantir a segurança e a eficácia de produtos à base de plantas (ROMERO-JIMÉNEZ, *et al.*, 2005). Existe um forte interesse em caracterizar o potencial genotóxico dos compostos vegetais utilizados na saúde humana (CHACON, *et al.*, 2002). As pesquisas que envolvam a genotoxicidade de drogas representam um passo importante no desenvolvimento de um novo produto, pois tal parâmetro pode prever um potencial genotóxico, auxiliando no desenvolvimento de compostos químicos menos tóxicos (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000).

Algumas plantas de uso popular, apesar de possuírem propriedades farmacológicas, também podem causar alterações no DNA, apresentando efeitos genotóxicos. É necessário precaução quando usar um medicamento de uso popular, sendo de grande importância a

avaliação, por meio de testes pré-clínicos, de sua genotoxicidade antes de usá-los (WATTANAPLTAYAKUL, *et al.*, 2005).

2.3-Citotoxicidade e a triagem de novas drogas

A bioprospecção de recursos naturais, usando procedimentos de triagem, é uma técnica que tem sido usada por décadas, e o interesse farmacêutico nesse processo, baseado em estratégias de triagem *in vitro*, vem crescendo ao longo dos anos (ELISABETSKY; SHANLEY, 1994).

Sistemas de cultura de células *in vitro* não só podem imitar o estado fisiopatológico de várias doenças, como também podem fornecer informações úteis sobre a boa previsibilidade de compostos bioativos *in vivo*, bem como nos perfis de toxicidade (RAUSCH, 2006). Dentro desse contexto, os processos de triagem em células estão se tornando cada vez mais conhecidos como uma excelente ferramenta para a avaliação de novas drogas (WANG, *et al.*, 2011).

Na maioria dos ensaios que envolvem biologia celular a contagem de células e a avaliação da viabilidade celular são parâmetros essenciais e devem ser analisados. Para isso, diversos ensaios foram desenvolvidos e baseiam-se na avaliação da integridade da membrana, alterações morfológicas, proliferação celular e conteúdo de proteínas da população de células (GLOECKNER, *et al.*, 2001).

Ensaio de citotoxicidade *in vitro*, realizados em cultura de células tumorais, têm se tornado importante para a avaliação de agentes anticâncer, principalmente durante a fase de triagem reduzindo a experimentação em animais (CINGI, *et al.*, 1991), e além disso é possível avaliar um maior número de substâncias em um menor tempo (SUGGITT; BIBBY, 2005).

A avaliação de drogas anticâncer, através de testes de citotoxicidade, requer técnicas sensíveis, reprodutíveis e que possam ser aplicadas para testes em larga escala (PAGE; PAGE; NOEL, 1993). Geralmente esses ensaios citotóxicos fundamentam-se em comparar a taxa de proliferação de uma linhagem celular neoplásica, na presença e ausência de uma substância teste, geralmente após um tempo determinado. Nesses ensaios, diferentes linhagens de células podem ser usadas, inclusive células não neoplásicas a fim de avaliar uma possível seletividade (HOUGHTON, *et al.*, 2007). Os modelos de triagem citotóxicos fornecem importantes dados preliminares que podem ajudar a selecionar plantas com potencial propriedade antitumoral para pesquisas futuras, contribuindo de forma expressiva para o desenvolvimento de drogas anticâncer (ITHARAT, *et al.*, 2004; SUGGITT; BIBBY, 2005).

O ensaio de proliferação celular MTT (microtetrazólio) quantifica a habilidade de células viáveis reduzirem o sal amarelo tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), para o cristal roxo formazan usando a enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Outro composto tetrazólio, XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5sulfonil)-5 [(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazólio) tem sido utilizado, este confere uma vantagem em relação ao MTT, pois pode ser reduzido para o cristal de formazan solúvel em água pelas enzimas mitocondriais. É menos tóxico e não necessita ser libertado por lise das células. Já o ensaio do Alamar blue é baseado na coloração por resazurina, o qual exibe a mudança colorimétrica e a fluorimétrica relacionada à atividade metabólica celular (AHMED, *et al.*, 1994).

Ensaio como o MTT ou XTT, embora confiáveis não são sensíveis o suficiente e são considerados caros para o rastreamento de grande escala ou ainda usam reagentes que podem ser prejudiciais à saúde (PAGE; PAGE; NOEL, 1993). O ensaio conhecido como Alamar blue surgiu como uma alternativa nas pesquisas em biologia celular. Este corante é reduzido da forma não-fluorescente para a forma fluorescente devido à atividade metabólica das células.

Este ensaio tem sido comumente usado para a determinação da citotoxicidade e avaliar o efeito de drogas (GLOECKNER, *et al.*, 2001).

Page; Page; Noel, (1993) descreveram através do ensaio Alamar blue, que em um teste de duas horas, este substrato não tóxico pode detectar desde quantidades tão baixas como 200 células por poço, até medidas com 20.000 células por poço. Além disso, eles ainda observaram que quando avaliado a citotoxicidade da Daunorrubicina, por este método comparado ao ensaio XTT, os valores encontrados de CI_{50} foram comparáveis, no entanto o ensaio do alamar blue é mais econômico e os resultados são obtidos em menos tempo. Assim, o ensaio do alamar blue pode ser usado com vantagem para o rastreamento *in vitro* em larga escala de fármacos anticancerígenos e outros agentes citotóxicos.

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) tem um grande programa de triagem capaz de testar 10.000 substâncias por ano (YOUNES, *et al.*, 2007). O programa de triagem do NCI acontece em duas etapas, começando com a avaliação dos compostos frente a 60 linhagens de células em concentração única de 10 μ M. Aqueles que exibem redução significativa da proliferação celular são avaliados em cinco níveis de concentração (Screening Services, 2014).

Foi através desse programa que algumas das importantes drogas anticâncer foram descobertas, como o paclitaxel (*Taxus brevifolia* Nutt.), camptotecina (*Camptotheca acuminata* Decne) e podofilotoxina/ etoposídeo (semi-sintético obtido da *Podophyllum peltatum* L.) (Tabela 2), todas as quais são atualmente utilizadas na terapia do câncer (YOUNES, *et al.*, 2007).

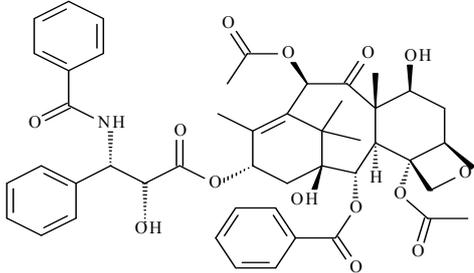
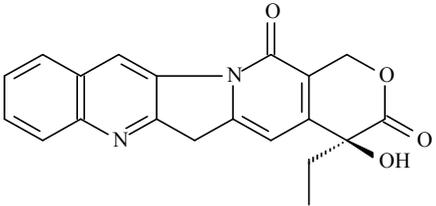
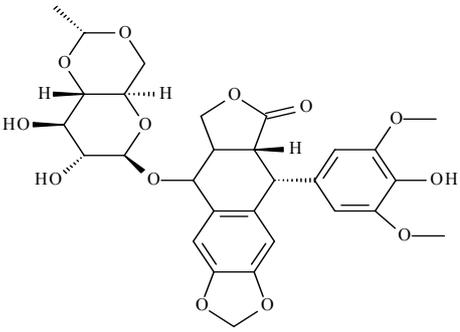
Origem	Princípio ativo	Estrutura química
<i>Taxus brevifolia</i>	Paclitaxel	
<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotencina	
<i>Podophyllum peltatum</i>	Podofilotoxina/ Etoposídeo	

Tabela 2- Substâncias obtidas de plantas utilizadas na terapia do câncer.

FONTE: Adaptado de COSTA-LOTUFO, *et al.*, 2010.

Pesquisas realizadas com a espécie *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae), levaram ao isolamento dos primeiros compostos anticancerígenos obtidos de plantas, os alcalóides vimblastina e vincristina, conhecidos como alcalóides da vinca, que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de alguns tipos de câncer como o câncer de ovário, testículos e leucemias. A descoberta do paclitaxel, obtido a partir das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt.

(Taxaceae), é outra evidencia da importância de um produto natural na descoberta de uma droga. O paclitaxel é bastante ativo contra o câncer de mama e o câncer de ovário (MEHNDIRATTA, *et al.*, 2011).

A descoberta de drogas a partir de produtos naturais tem sido importante no tratamento do câncer, suas aplicações clínicas geram expectativas para a terapêutica dessa doença, já que muitas das drogas anticâncer foram obtidas de produtos naturais ou derivadas destes (CRAGG; NEWMAN, 2005). Assim, compostos derivados de plantas têm desempenhado um importante papel no desenvolvimento de diversos compostos anticâncer clinicamente úteis (SHAH UNNATI, *et al.*, 2013).

Diante dos numerosos recursos, principalmente os vegetais, presume-se que estes sejam uma fonte promissora existente na natureza, com propriedades para o tratamento do câncer, e a grande maioria ainda não foi avaliada. É recomendável que as plantas sejam estudadas de maneira que o tratamento do câncer possa ser melhorado. Mesmo que um composto isolado de planta não seja o produto final, mas este pode levar ao desenvolvimento de um potencial agente antineoplásico (SHAH UNNATI, *et al.*, 2013).

2.4 - Óleo essencial e Gênero *Eugenia*

As plantas produzem uma diversidade de compostos, chamados de metabólitos secundários, considerados moléculas biologicamente ativas, que não estão envolvidas em processos bioquímicos primários, como desenvolvimento da planta e reprodução. A síntese desses produtos pode estar relacionada a diversos processos ecológicos, como defesa contra insetos e microorganismos, interação planta-planta e atração de polinizadores (KAUR, *et al.*,

2011). A biossíntese desses metabólitos pode estar ligada a estímulos ambientais, sazonais ou externos (BODAS, *et al.*, 2012).

Os produtos do metabolismo secundário das plantas podem possuir atividade biológica em outros organismos vivos, e influenciar processos metabólicos e/ ou a taxa de crescimento de microorganismos. Por essa razão, é crescente o interesse de indústrias farmacêuticas a fim de obter novos produtos a partir de compostos bioativos obtidos de plantas (BODAS, *et al.*, 2012).

O uso de produtos naturais de origem vegetal, como óleos essenciais, tem sido uma fonte importante para a descoberta de um agente medicinal (SHARMA, *et al.*, 2009). Os óleos essenciais são definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, constituídos de metabólitos secundários concentrados comumente nas folhas, cascas ou frutos de plantas aromáticas. É crescente o interesse nessas amostras devido às múltiplas funções que apresentam (VICTORIA, *et al.*, 2012).

A composição química de óleos essenciais depende de diversos fatores, como genótipo, condições climáticas, parte da planta utilizada, localização geográfica, estação de coleta, estágio de desenvolvimento e processamento do material vegetal antes da extração. Desse modo, é possível que variedades da mesma espécie possuam composição diferente (VERMA; PADALIA; CHAUHAN, 2014).

Os óleos essenciais podem conter diversos componentes, os quais são representados em sua grande maioria por monoterpenos e sesquiterpenos e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, fenóis e óxidos), sendo que o primeiro pode representar até 90% da constituição química de um óleo essencial (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014). Geralmente a composição é um equilíbrio de vários compostos, embora em muitas espécies um constituinte possa prevalecer sobre os outros (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014). Do ponto de vista químico, são considerados misturas bastante complexas, com a presença de

vários componentes, o que torna difícil para a identificação dos responsáveis por suas propriedades biológicas. No entanto, óleos essenciais são considerados uma fonte de componentes naturais com propriedades terapêuticas promissoras, e por esse motivo pesquisas a cerca do seu potencial biológico são realizadas (VICTORIA, *et al.*, 2012).

Podem apresentar diferentes funções biológicas em seres humanos, animais e outras plantas. São bastante úteis no tratamento de diferentes doenças e sua aplicação medicinal vem crescendo pela população, bem como as investigações científicas a respeito dessas propriedades. São comercialmente importantes em diferentes ramos da indústria, como: farmacêuticas, agrônômicas, alimentos, cosméticos dentre outras (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Na indústria farmacêutica, óleos essenciais têm sido empregados como medicamentos, e no Brasil pode-se citar alguns exemplos de aplicações de sucesso, como da espécie *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), um medicamento anti-inflamatório de uso tópico (Acheflan®) e o óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae), o qual é amplamente utilizado em tratamentos odontológicos e como antisséptico para a higiene oral (VICTORIA, *et al.*, 2012).

O uso de óleos essenciais tem se tornando cada vez mais popular, e por sua complexidade são descritos para uma variedade de atividades biológicas, como: antibacteriana (DIAO, *et al.*, 2014), antioxidante (MARTINS, *et al.*, 2014), antiviral (KOCH, *et al.*, 2008), alívio da dor e inflamação (GUILHON, *et al.*, 2011) e anticâncer (BOSTANCIOĞLU, *et al.*, 2012). Salazar *et al.* (2011) em processo de triagem, investigaram a atividade anticâncer de 50 óleos essenciais, onde chegaram a 10 potentes candidatos. Diversos estudos vêm sendo realizados, utilizando óleos essenciais e seus componentes, a fim de mostrar o efeito anticâncer quando testados em uma série de linhagens de células tumorais (Tabela 3).

Espécie (óleo essencial)	Linhagem celular	Referência
<i>Croton flavens</i>	Carcinoma de pulmão humano (A-549) e adenocarcinoma de colorretal humano (DLD-1)	Sylvestre, <i>et al.</i> , 2006
<i>Cymbopogon flexuosis</i>	Carcinoma cervical humano (SiHa), carcinoma de colorretal humano (502713), neuroblastoma humano (IMR-32)	Sharma, <i>et al.</i> , 2009
<i>Cyperus kyllingia</i>	Retinoblastoma humano (A-549)	Khamsan, <i>et al.</i> , 2011
<i>Rosmarinus officinalis</i>	adenocarcinoma de ovário (SK-OV-3), carcinoma de ovário (HO-8910) e carcinoma hepatocelular (Bel-7402)	Wang, W. <i>et al.</i> , 2012
<i>Guatteria friesiana</i>	Adenocarcinoma de colorretal humano (HCT-8), adenocarcinoma de mama humana (MDA-MB - 43) e leucemia (HL-60)	Britto, <i>et al.</i> , 2012
<i>Xylopia laevigata</i>	Adenocarcinoma de ovário humano (OVCAR-8), glioblastoma humano (SF-295), adenocarcinoma de colorretal humano (HCT-116) e leucemia (HL-60)	Quintans, <i>et al.</i> , 2013

Tabela 3- Potencial anticâncer de óleos essenciais em diferentes linhagens de células.

Dentro desse contexto, encontra-se o gênero *Eugenia*, considerado um dos maiores da família Myrtaceae, com mais de 2000 espécies distribuídas desde o sul do México até o Uruguai e Argentina, com um pequeno número de espécies na África (MAZINE; SOUZA, 2008). No Brasil, pode ser encontrada por todo o país, em diferentes tipos de vegetações (ROMAGNOLO; SOUZA, 2006). Em análises fitoquímicas, esse gênero é descrito como rico em metabólitos secundários (ZAKI, *et al.*, 2013). Além disso, segundo Romagnolo; Souza (2006) muitas das espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* são ricas em óleos essenciais que são frequentemente utilizados na medicina popular.

Os óleos essenciais obtidos a partir de espécies do gênero *Eugenia* são caracterizados por sua diversidade química. Em geral, há uma predominância de sesquiterpenos, seguido de monoterpenos em uma menor fração, como a pesquisa realizada por Lago, *et al.* (2011), onde encontraram predominância de sesquiterpenos na espécie *Eugenia uniflora*. Os constituintes

mais abundantes encontrados nas espécies do gênero *Eugenia* são o α -pineno (monoterpeno) e o β -cariofileno (sesquiterpeno) (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Pesquisas evidenciam o potencial biológico de espécies do gênero *Eugenia* (BAG, *et al.*, 2012; TRAJANO, *et al.*, 2010; DE CARVALHO JUNIOR, *et al.*, 2014; VICTORIA, *et al.*, 2012; SANTOS, *et al.*, 2012). No entanto, poucos estudos demonstram o potencial anticâncer de óleos essenciais obtidos desse gênero, como o realizado por Ogunwande *et al.* (2005) que encontraram a presença de terpenos, como os sesquiterpenos e monoterpenos, no óleo essencial obtido da espécie *Eugenia uniflora*, bem como a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais humanas PC-3 (adenocarcinoma de próstata), Hep G2 (carcinoma hepatocelular) e Hs578T (carcinoma de mama).

Entre os pesquisadores, cresce o interesse em pesquisar, em várias fontes biológicas, o efeito terapêutico anticâncer, inclusive para o desenvolvimento de uma nova droga (DUYMUS, *et al.*, 2014). Portanto, baseado no potencial de produtos naturais, grande expectativa é criada para o tratamento eficaz dos diferentes tipos de tumor, através da triagem ordenada, inclusive de óleos essenciais (SHARMA, *et al.*, 2009).

3-OBJETIVOS

3.1-Geral

Determinar o potencial anticâncer *in vitro* de óleos essenciais obtidos das folhas de diferentes espécies do gênero *Eugenia*, bem como identificar os componentes químicos e determinar a genotoxicidade.

3.2-Específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia* em células neoplásicas e não neoplásicas;
- Selecionar as espécies com melhor resultado citotóxico;
- Identificar os componentes químicos das amostras citotóxicas;
- Avaliar o potencial anticlonogênico das amostras selecionadas;
- Avaliar a atividade das amostras citotóxicas no teste de motilidade celular;
- Avaliar o potencial inibidor de metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9);
- Determinar a genotoxicidade em linhagem celular não neoplásica.

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Delineamento experimental

O desenvolvimento das atividades ocorreu como mostrado na Figura 3.

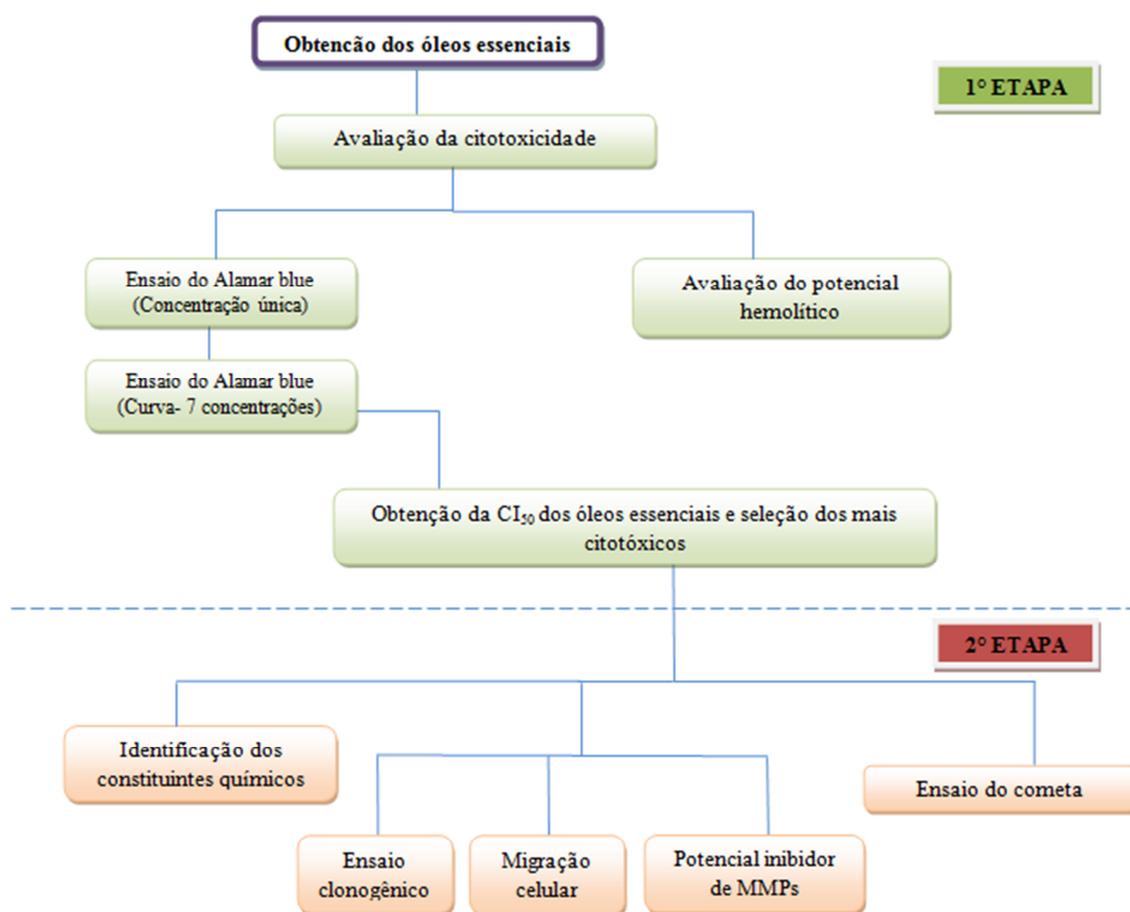


Figura 3- Delineamento experimental das atividades desenvolvidas.

4.2- Obtenção dos óleos essenciais

Foram utilizadas nesse estudo amostras de óleos essenciais obtidos a partir das folhas de espécies do gênero *Eugenia* (Myrtaceae) - *Eugenia cuspidifolia*, *Eugenia tapacumensis*, *Eugenia anastomosans*, *Eugenia diplocampta*, *Eugenia feijoi*, *Eugenia citrifolia*, *Eugenia ocrophelea*, *Eugenia pseudopsidium*, *Eugenia marlenae*. Todas as amostras utilizadas nessa pesquisa foram cedidas pelo Prof^o Dr. Marcos Machado, do Departamento de Química, da UFAM.

Todas as espécies do gênero *Eugenia* utilizadas nessa pesquisa foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada na cidade de Manaus- AM, entre os meses de agosto de 2012 a outubro de 2013. A identificação botânica foi realizada pela MSc Maria Anália Duarte de Souza, por comparação de exsiccatas, previamente identificadas, com as exsiccatas depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

Os ramos coletados foram transportados ao laboratório de Química dos Produtos Naturais da UFAM, e secos a temperatura ambiente por aproximadamente duas semanas. As folhas sadias, desprovidas de qualquer ferimento, ataque de microrganismo ou alteração da coloração foram selecionadas, lavadas com água destilada e trituradas manualmente.

Os óleos essenciais foram obtidos a partir de uma alíquota de 200g das folhas trituradas em 2 L de água destilada pelo método de hidrodestilação por arraste a vapor d'água utilizando o aparelho tipo Clevenger modificado, em um tempo de extração de 4h. Após esse período os óleos essenciais obtidos foram secos com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e armazenados em frascos de vidro tipo âmbar devidamente identificados e mantidos a - 8 °C.

4.3-Linhagens e cultura celular

Foram utilizadas as linhagens celulares neoplásicas de melanoma humano (SK-MEL 19), carcinoma colorretal humano (HCT 116); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7); adenocarcinoma gástrico humano (ACP02); fibrosarcoma humano (HT1080); carcinoma de ovário humano (ES-2) e (NIHOVCAR) e a linhagem não neoplásica de fibroblasto humano (MRC-5).

As linhagens foram cultivadas em garrafas de cultura com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina. As células foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C.

Para os ensaios biológicos todos os óleos essenciais foram dissolvidos em Dimetilsufóxido (DMSO), e para cada ensaio diluídos em meio de cultura para a concentração teste desejada. A concentração final de DMSO em todos os ensaios não excedeu 0,2% (v/v).

4.4- Avaliação da citotoxicidade

4.4.1-Ensaio Alamar Blue

O teste do Alamar Blue foi realizado para a triagem citotóxica dos óleos essenciais das espécies de *Eugenia* em linhagens neoplásicas (HCT 116, MCF-7, ACP02, ES-2, NIHOVCAR e SK-MEL 19) e não neoplásica (MRC-5). Foi desenvolvido conforme metodologia descrita por Ahmed *et al.* (1994), com modificações. As células foram

transferidas para microplacas de 96 poços na densidade $0,5 \times 10^4$ células por poço, e permaneceram em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas, as células receberam o tratamento com os óleos essenciais na concentração de 50 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado DMSO (0,2%), e como controle positivo Doxorubicina, na concentração de 5,0 µg/mL. O período de tratamento foi de 72 horas, com a placa mantida em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período foi adicionado 10 µL do Alamar blue (0,02%), posteriormente feita a leitura das placas em leitor de microplaca, nos comprimentos de onda de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm.

4.4.2-Avaliação da atividade hemolítica

O teste do potencial hemolítico foi realizado de acordo com Jimenez *et al.* (2003) com modificações. Foi coletado o sangue de camundongos da espécie *Mus musculus* Swiss, por via orbital, e diluído em solução salina (NaCl 0,85% +CaCl₂ 10 mM); posteriormente o sangue foi lavado por duas vezes em solução salina e centrifugado (1500 rpm/ 10 min.). Um *pellet* de eritrócitos foi obtido e ressuspenso em solução salina e então preparada uma solução eritrocitária (SE) a 2%. Em microplatas de 96 poços, os óleos essenciais obtidos das espécies de *Eugenia* foram testados na concentração de 2000 µg/mL. Ao controle negativo foi adicionado DMSO (0,2%) e aos poços do controle positivo Triton X- 100 (0,2%). Por fim, a cada poço foi adicionado 100 µL da SE. Após esse procedimento, as amostras foram incubadas por 1 hora, sob agitação constante, a temperatura ambiente (26°C ± 2°C) e posteriormente centrifugadas (1500 rpm/10 min). O sobrenadante foi transferido para outra microplaca para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

As amostras que causaram hemólise, no ensaio em concentração única, foram selecionadas para realização do teste em sete diluições sucessivas para obtenção da curva e cálculo da CE_{50} (concentração efetiva que causa hemólise em 50%).

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas, com protocolo número 116/2012- CEEA.

4.5- Identificação dos componentes químicos

A caracterização química dos óleos essenciais obtidos das espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) foi realizada no Centro Biotecnológico da Amazônia (CBA). Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gasosa de alta resolução (equipamento GC2010-FID e GCMS-QP2010- Shimadzu) com detector de ionização de chama (CG- DIC), e detector de espectrômetro de massas (CG-EM). Na análise por CG-DIC foi empregada uma coluna capilar DB-5 (5% difenil, 95% polidimetilsiloxano) (30 m x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura do filme), foi utilizado como gás de arraste o Hidrogênio. Na análise por CG-EM foi utilizada uma coluna capilar DB-5 ms, com as mesmas especificações da coluna supracitada, usou-se como gás de arraste o Hélio.

As condições cromatográficas foram similares para ambas às análises: Temperatura do injetor e detector 250 °C, temperatura programada do forno de 60 a 240 a 3 °C /min. Para análise, foi injetado no cromatógrafo 1,0 µL da solução de 1 mg/mL dos óleos voláteis em Hexano grau HPLC. O modo utilizado foi Split (1:20), a vazão do gás foi de 1 mL/min. A identificação dos constituintes químicos foi realizada através da análise comparativa dos índices de retenção cromatográficos calculado, e dos espectros de massas obtidos conforme os descritos na literatura (ADAMS, 2007).

4.6-Ensaio clonogênico

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita por Plumb (2004). As células da linhagem HCT 116 ($0,5 \times 10^4$ / 2 mL) foram transferidas para placas de 6 poços e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas, foi adicionado aos poços os óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) nas concentrações de 7,5, 15 e 30 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado DMSO (0,2%), e como controle positivo Doxorrubicina (5,0 µg/mL). O crescimento das colônias foi observado durante 10 dias, período no qual a placa permaneceu sob condições de cultivo ideais.

Após esse período as células foram fixadas com metanol e em seguida coradas com cristal violeta (2%). O número de colônias foi quantificado e analisado. O efeito anti-clonogênico foi observado pela redução no número de colônias.

4.7-Ensaio de motilidade celular

Para avaliação da capacidade de migração celular foi utilizado o método descrito por Liang; Park; Guan (2007). Neste ensaio, foram utilizadas células da linhagem HCT 116, transferidas para placas de 12 poços, na densidade de 50×10^4 / mL. Após 24 h, foi adicionado o tratamento com os óleos de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) nas concentrações de 7,5, 15 e 30 µg/mL. Para o controle negativo foi utilizado DMSO (0,2%) e para o controle positivo Doxorrubicina (5,0 µg/mL). Após o período de 24 h, provocou-se a descontinuidade (com uma ponteira de 0,5-10µL). A cada 24 h foi observado e fotografado o comportamento das células por um período total de 48 h.

4.8- Determinação da atividade enzimática de MMPs (MMP-2 e MMP-9)

A atividade de MMPs (MMP-2 e MMP-9) foi determinada utilizando como substrato a gelatina, através de método zimográfico, de acordo como descrito por Kaji *et al.* (2003). Essa técnica foi utilizada para avaliar a atividade de MMP-2 e MMP-9. Para esse ensaio utilizou-se a linhagem celular HT1080.

4.8.1-Obtenção das proteínas coletadas no meio de cultura

Para o ensaio, as células (HT1080) foram transferidas para placas de 12 poços na concentração de 20×10^4 células/ mL. Após 24 horas, as células foram tratadas com os óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3), nas concentrações de 7,5, 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$, nos tempos de 24 e 48 horas. Após cada tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado e centrifugado (3000 rpm/5 minutos). As proteínas do meio de cultura foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY, *et al.*, 1951).

4.8.2-Mobilidade eletroforética das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina

Para separação das proteínas, foi utilizado gel de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel Eletrophoresis*) com 10% de acrilamida e 1% de gelatina, no qual foram colocados 30 μg de proteínas por canal. O gel foi submetido à eletroforese (120 V por 1 hora e 30 minutos) para separação das proteínas.

4.8.3-Incubação e revelação do gel

Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes por 15 minutos com 2,5% Triton X-100, para retirar o SDS. Em seguida, o gel foi então incubado com tampão de incubação (0,05 M TrisHCl pH 8, 5 mM CaCl₂, 5 µM ZnCl₂), *overnight*, a 37°C, para a degradação do substrato pelas MMPs. Logo depois, o gel foi corado com 0,5% coomassie brilliant blue R-250 por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante, e descorado com metanol 10% e ácido acético 10%. As bandas mais claras, que representam a degradação, foram comparadas e analisadas utilizando o software ImageJ.

4.9-Avaliação da genotoxicidade

4.9.1-Ensaio do cometa – pH alcalino e neutro

O teste do cometa alcalino foi realizado conforme metodologia descrita por Singh, *et al.* (1988), com alterações. Neste teste foi utilizado a linhagem celular não neoplásica, MRC-5 na densidade celular 20×10^4 , placa de 24 poços. A placa foi incubada em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24h. Após esse tempo, as células foram tratadas com os óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3), nas concentrações de 7,5, 15 e 30 µg/mL; DMSO (0,2%) como controle negativo, e Doxorrubicina (10 µg/mL) como controle positivo, durante 3 horas.

A partir de cada tratamento, foi retirado o volume celular de 10 µL e adicionado a 110 µL de agarose de baixo ponto de fusão, e então colocadas em lâminas de microscopia,

pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal e cobertas com lamínulas, para distribuição homogênea das amostras. As lâminas foram mantidas por 5 minutos a 4°C, para solidificação da agarose (para cada amostra foram preparadas duas lâminas). Após a solidificação, as lâminas foram incubadas em solução de lise *overnight* a 4°C, para remoção dos componentes celulares, restando o DNA (“nucleóide”) ocupando o espaço que antes seria o núcleo da célula. Após esse período, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese, e adicionada à solução de eletroforese (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH>13), permanecendo por 20 minutos a 4°C para permitir o desempacotamento do DNA.

A eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 20 minutos, a 20 V e com corrente de 300 mA. Posteriormente, colocou-se as lâminas em solução de neutralização por 5 minutos, para retirar a alcalinidade, secas e fixadas em etanol. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando 40 µL da solução de Brometo de Etídio (20g/mL) sobre as lâminas.

Os procedimentos para o ensaio do cometa em pH neutro foram iguais aos realizados para o cometa alcalino, com exceção da solução de eletroforese, a qual foi preparada com Acetado de sódio a 300 mM e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 e a corrida foi conduzida na ausência de luz por 20 min, a 25 V ou corrente de 300 mA (WOJEWÓDZKA; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2002).

A análise dos cometas foi realizada de acordo com tamanho e intensidade da cauda, seguindo os seguintes padrões: classe 0: sem dano, sem a cauda; classe 1: com a cauda menor que o diâmetro da cabeça (nucleóide); classe 2: com o comprimento da cauda 1-2x o diâmetro da cabeça; classe 3: com a cauda maior que 2x o diâmetro da cabeça e classe 4: desintegrado, cometa sem a cabeça definida.

Para cada lamina foram contados 50 cometas, sendo classificados de acordo com o tamanho da “cauda” do cometa, indicando o grau de quebra do DNA.

O índice de dano (ID) foi calculado como o total de produtos da multiplicação entre os números de cometa de cada classe e grau de cada cometa:

$$ID \text{ total} = 0. (n \text{ Classe } 0) + 1. (n \text{ Classe } 1) + 2. (n \text{ Classe } 2) + 3. (n \text{ Classe } 3) + 4. (n \text{ Classe } 4)$$

A frequência de dano foi calculada como a porcentagem de todos os tipos de cometa encontrado (grau 0 a grau 4) em relação ao total de cometas contados (50):

$$Frequência \text{ de danos} = [(50 - n \text{ Classe } 0) \cdot 100] / 50$$

5-Análise estatística

Para os ensaios de citotoxicidade frente as linhagens celulares, foram realizados experimentos em triplicata e os valores obtidos foram utilizados para cálculos de CI_{50} , a partir das curvas de concentração dose-resposta, com intervalo de confiança de 95%.

As análises estatísticas dos demais ensaios foram realizadas por análise de variância (ANOVA) *one-way*, e *two-way* seguido de teste Tukey e Bonferroni para comparação entre os grupos. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e os dados foram analisados no programa GGraph Pad prism 5.0.

5- RESULTADOS

5.1- Citotoxicidade

5.1.1- Ensaio Alamar blue

O efeito sob a viabilidade celular, dos óleos essenciais utilizados nesse estudo, nas linhagens de células MCF-7, HCT 116, SK-Mel 19, ACP02, ES-2, NIHOVCAR e MRC-5, utilizando o ensaio do Alamar blue, estão representados na Tabela 4.

A partir dos resultados do teste em concentração única (50 µg/mL), as amostras com viabilidade celular <10% foram selecionadas para realização do teste em sete diluições sucessivas para obtenção da curva e cálculo da CI_{50} (concentração necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%). Os óleos essenciais das espécies do gênero *Eugenia* tiveram valores de CI_{50} variando entre 25,51 a 38,38 µg/mL na linhagem MRC-5 e para as linhagens tumorais os valores de CI_{50} variavam 4,52 a 35,9 µg/mL.

De acordo com os valores de CI_{50} nas linhagens tumorais, destaca-se o efeito citotóxico dos óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) (CI_{50} variando entre 6,22 a 26,17 µg/mL) e *E. tapacumensis* (3) (variando entre CI_{50} 4,69 a 24,35 µg/mL), e valores para a linhagem MRC-5 entre CI_{50} 25,51 e 36,12 µg/mL, respectivamente (Tabela 4), os quais foram selecionados para os testes anticâncer posteriores.

A partir da triagem de citotoxicidade foram definidas as concentrações utilizadas nos testes subsequentes.

Espécies	CI ₅₀ (µg/mL)						
	MRC-5	MCF-7	HCT 116	SK-Mel 19	ACP02	ES-2	NIHOVCAR
<i>E. cuspidifolia</i> (1)	25,51 (22,30-22,19)	18,11 (13,80-23,75)	15,25 (12,98-17,93)	26,17 (24,09-28,43)	> 50	6,22 (4,8- 8,1)	>50
<i>E. cuspidifolia</i> (2)	>50	>25	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. cuspidifolia</i> (3)	>50	>25	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. tapacumensis</i> (1)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. tapacumensis</i> (2)	>50	>50	>50	>25	>50	4,52	>50
<i>E. tapacumensis</i> (3)	36,12 (30,72-42,48)	24,35 (20,16-29,42)	12,37 (9,71-15,76)	>50	>50	4,69 (3,52-6,26)	>50
<i>E. tapacumensis</i> (4)	33,21 (31,05-35,52)	21,54 (16,25-28,57)	26,99 (22,22-32,80)	>50	>50	>50	>50
<i>E. anastomosa</i> (1)	36,21 (29,97-43,75)	19,23 (11,19-33,04)	30,42 (24,69-37-49)	>50	>50	7,64 (6,15-9,48)	>50
<i>E. diplocampta</i> (2)	>25	35,9 (28,13-45-81)	23,63 (16,30-34,24)	>50	>50	9,58 (7,57-12,13)	>50
<i>E. diplocampta</i> (3)	37,03 (29,38-46,68)	20,81 (12,92-33,50)	28,93 (23,97-34,93)	>50	>50	7,78 (6,31-9,6)	>50
<i>E. diplocampta</i> (4)	38,38 (32,64-45,14)	32,58 (23,99-44,25)	32,63 (29,22-36,43)	34,01 (31,98-36,16)	>50	>50	>50
<i>E. feijoi</i> (1)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. feijoi</i> (2)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. citrifolia</i> (1)	>50	>50	>50	30,16 (27,20-33,44)	30,94 (28,23-33,91)	> 25	>50
<i>E. citrifolia</i> (2)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. ocrophlea</i> (1)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. ocrophlea</i> (2)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. ocrophlea</i> (3)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. pseudopsidium</i> (1)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. pseudopsidium</i> (2)	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>E. marlenae</i>	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Doxorrubicina	1,23 (0,85-1,96)	0,56 (0,43-0,72)	0,42 (0,37-0,48)	0,45 (0,36-0,55)	0,7 (0,57-0,87)	0,09 (0,06-0,12)	0,03 (0,02-0,06)

Tabela 4- Efeito dos óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia* na viabilidade celular de linhagens tumorais e não tumoral (MRC-5) utilizando o ensaio Alamar blue, no tempo de tratamento de 72h. As amostras com viabilidade <10%, quando testadas em 50 µg/mL foram avaliadas em curva até sete diluições. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Os valores estão representados como CI₅₀ (intervalo de confiança de 95%). (1); (2); (3) e (4) representam indivíduos diferentes

5.1.2- Avaliação do potencial hemolítico

O potencial hemolítico dos óleos essenciais foi analisado em eritrócitos de camundongos *Swiss*. A maioria dos óleos essenciais testados não causaram hemólise, quando testadas em concentração única, com exceção das espécies *E. tapacumensis* (2), *E. citrifolia*, *E. ocrophelea* e *E. pseudopsidium*. Os valores de CE₅₀ variaram entre 98,42 e 389,2 µg/mL. Dados apresentados na Tabela 5.

Espécies	Hemólise
	CE ₅₀ (µg/mL)
<i>E. cuspidifolia</i> (1)	N
<i>E. cuspidifolia</i> (2)	N
<i>E. cuspidifolia</i> (3)	N
<i>E. tapacumensis</i> (1)	N
<i>E. tapacumensis</i> (2)	325,5 (285,7 – 371)
<i>E. tapacumensis</i> (3)	N
<i>E. tapacumensis</i> (4)	N
<i>E. anastomosa</i> (1)	N
<i>E. diplocampta</i> (2)	N
<i>E. diplocampta</i> (3)	N
<i>E. diplocampta</i> (4)	N
<i>E. feijoi</i> (1)	N
<i>E. feijoi</i> (2)	N
<i>E. citrifolia</i> (1)	389,2 (309,3 – 489,8)
<i>E. citrifolia</i> (2)	160 (132,5 – 193,1)
<i>E. ocrophea</i> (1)	116,7 (107,3 – 127)
<i>E. ocrophea</i> (2)	138,5 (98,59 – 194,6)
<i>E. ocrophea</i> (3)	98,8 (89,39 – 109,2)
<i>E. pseudopsidium</i> (1)	159,8 (138 – 184,9)
<i>E. pseudopsidium</i> (2)	98,43 (84,1 – 115,2)
<i>E. marlenae</i>	N

Tabela 5- Determinação do potencial hemolítico dos óleos essenciais de espécies de plantas do gênero *Eugenia* em eritrócitos de camundongos. As amostras que causaram hemólise, quando testadas a 2000 µg/mL, foram avaliadas em curva até sete diluições. Os valores estão representados como CE₅₀ (intervalo de confiança de 95%). (1); (2); (3) e (4) representam indivíduos diferentes; N- não causou hemólise.

5.2 - Identificação dos componentes químicos

Os constituintes químicos presentes nos óleos essenciais das espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) foram determinados através do método CG- DIC e CG-EM, usando os dados da biblioteca do equipamento e pelo índice de retenção das amostras. A tabela 6 apresenta a identificação dos constituintes químicos e as suas respectivas porcentagens. Foram identificados 22 constituintes no óleo essencial de *E. cuspidifolia* (1) e 9 de *E. tapacumensis* (3), em um total de 26 constituintes. Dentre os constituintes identificados 65,4% são sesquiterpenos e 34,6% são monoterpenos. Os componentes majoritários do óleo essencial de *E. cuspidifolia* (1) foram óxido de cariofileno (57,46%), α -copaeno (3,75%) e o hepóxido de humuleno II (3,37%), e na espécie *E. tapacumensis* (3) foram óxido de cariofileno (55,95%), α -copaeno (13,67%) e o cis-nerolidol (3,81%). Nas figuras 5 e 6 são mostrados os picos de retenção dos componentes químicos, com os valores (%) dos majoritários. Na figura 4, são ilustrados os componentes majoritários dos óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3).

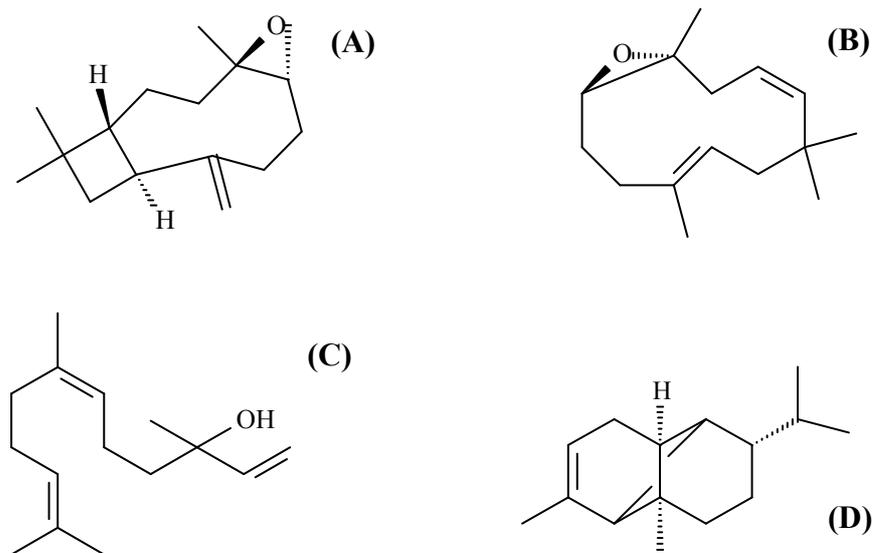


Figura 4- Estrutura química dos componentes majoritários dos óleos essenciais obtidos das folhas das espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3). (A)- Óxido de cariofileno; (B)- Epóxido de humuleno II; (C)- cis-nerolidol; (D) α -copaeno.

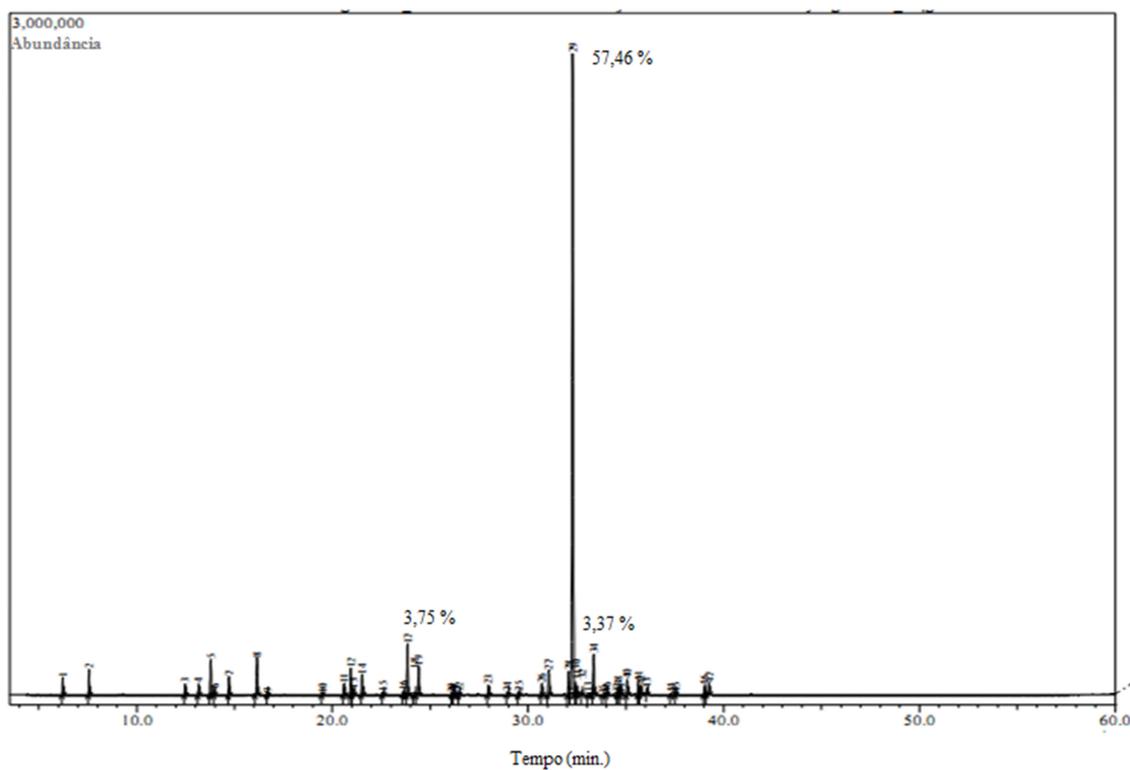


Figura 5-Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas da espécie *E. cuspidifolia* (1). (17: α -copaeno (3,75%); 29: óxido de cariofileno (57,46%); 34- hepóxido de humuleno II (3,37%).

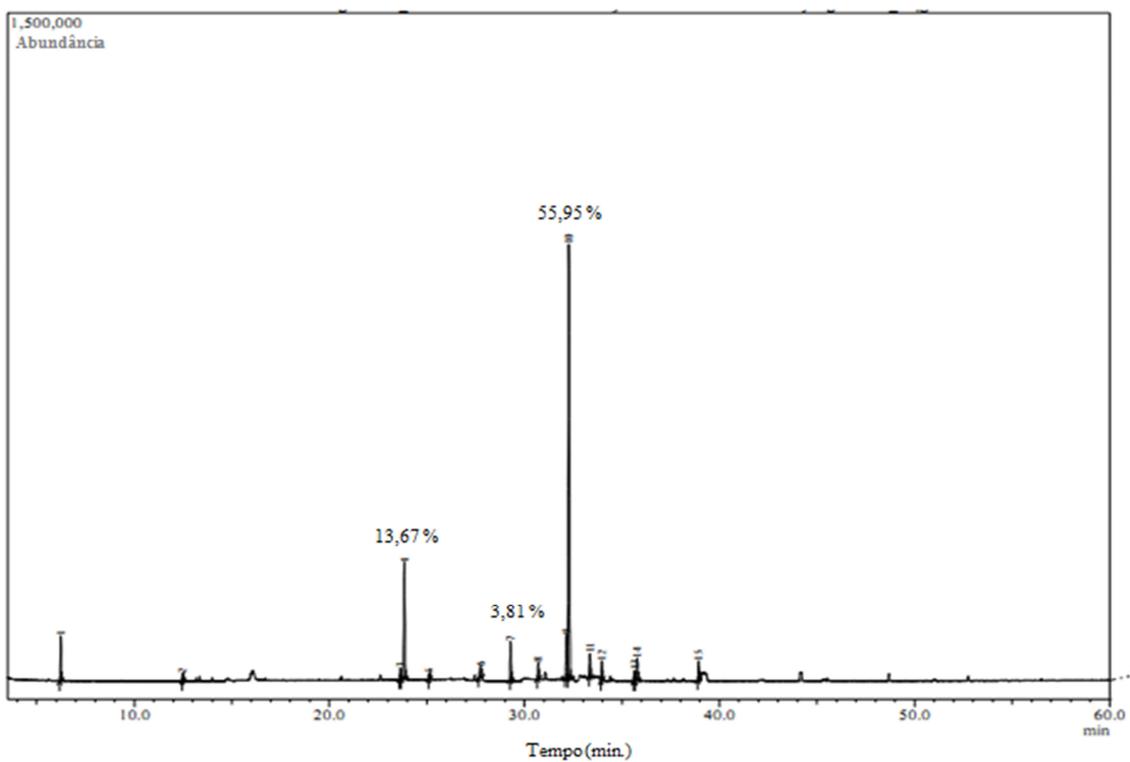


Figura 6-Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas da espécie *E. tapacumensis* (3). (4: α -copaeno (13,67%); 7: cis-nerolidol (3,81%); 10- óxido de cariofileno (55,95%).

Componentes químicos	<i>E. cuspidifolia</i> (1)				<i>E. tapacumensis</i> (3)		
	IRI	IRc	Área (%)	SI (%)	IRc	Área (%)	SI (%)
α -pineno	932	933	0,82	92	933	3,28	93
β -pineno	979	977	1,3	93	-	-	-
α -campholenal	1122	1124	0,74	93	-	-	-
trans-pinocarveol	1135	1137	2,67	92	-	-	-
trans-verbenol	1140	1143	0,4	82	-	-	-
pinocarvona	1160	1160	1,29	88	-	-	-
mirtenal	1195	1194	2,89	92	-	-	-
verbenona	1204	1206	0,22	90	-	-	-
ρ meta-1,4-dien-7-ol	1325	1321	1,54	-	-	-	-
trans-3-(ethoxycarbonil)-2,4-dimetil-4-pentanolida	-	1269	0,15	87	-	-	-
ácido propainoico,2-metil,3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentil ester	-	1370	0,34	91	1370	1,19	90
α -copaeno	1374	1375	3,75	92	1375	13,67	90
β -bourboneno	1387	1384	0,29	81	-	-	-
β -elemeno	1389	1391	2,39	93	-	-	-
β -copaeno	1430	1428	0,17	-	-	-	-
α -trans bergamoteno	1432	1435	0,12	83	-	-	-
9-epi E cariofileno	1464	1551	2,55	-	-	-	-
germacreno-D	1480	1475	0,74	84	-	-	-
espathulenol	1577	1576	1,99	86	-	-	-
óxido de cariofileno	1583	1582	57,46	93	1581	55,95	91
viridiflorol	1592	1586	1,13	84	-	-	-
epóxido de humuleno II	1608	1607	3,37	83	1607	2,72	84
cis-nerolidol	-	-	-	-	1539	3,81	-
muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	-	-	-	-	1630	1,98	-
epi-zizanona	-	-	-	-	1669	1,03	-
mustakona	1676	-	-	-	1675	3,42	-
Total			86,32			87,05	
		Outros	13,68		Outros	12,95	
Monoterpenos hidrocarbonados (%)			9			11,11	
Monoterpenos oxigenados (%)			31,08			-	
Sesquiterpenos hidrocarbonados (%)			31,08			11,11	
Sesquiterpenos oxigenados (%)			27,27			77,77	

Tabela 6- Constituintes químicos dos óleos essenciais obtidos das folhas das espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3). IRI- índice de retenção da literatura (Segundo ADAMS, 2007); IRc- índice de retenção calculado; SI- índice de similaridade.

Apesar dos baixos valores do índice de similaridade (Tabela 6), vale ressaltar que além da biblioteca do equipamento (WILEY-7) outras fontes foram utilizadas para confirmação dos constituintes químicos, como ADAMS, WEBBOOK NIST e PHEROBASE.

5.3 - Ensaio clonogênico

Os resultados obtidos no ensaio clonogênico são mostrados na figura 7. Observou-se redução significativa ($p < 0,05$) do número de colônias após 10 dias de tratamento com o óleo essencial de *E. cuspidifolia* (1) em todas as concentrações testadas, comparando-se ao tratamento com DMSO (0,02%), enquanto que o óleo essencial de *E. tapacumensis* (3) reduziu o número de colônias ($p < 0,05$), nas concentrações 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$. O tratamento com Doxorrubicina (5,0 $\mu\text{g/mL}$) também causou redução significativa ($p < 0,05$). Os dados estão representados no Gráfico 2.

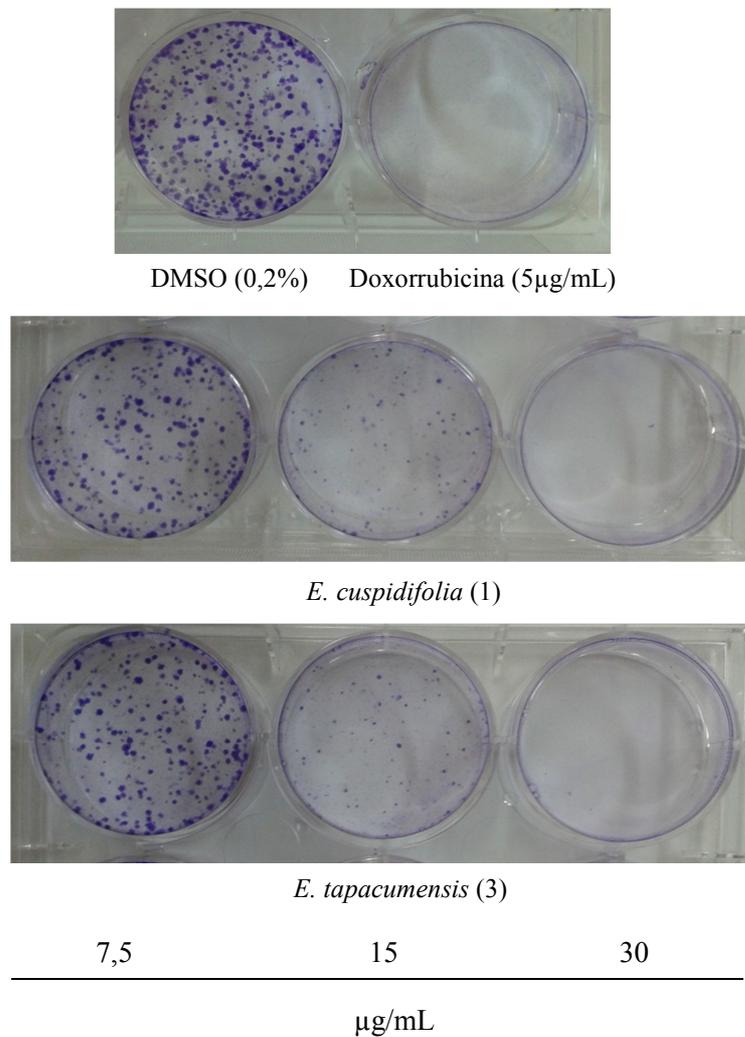


Figura 7- Efeito dos óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) no ensaio clonogênico, utilizando a linhagem HCT 116, após 10 dias de tratamento.

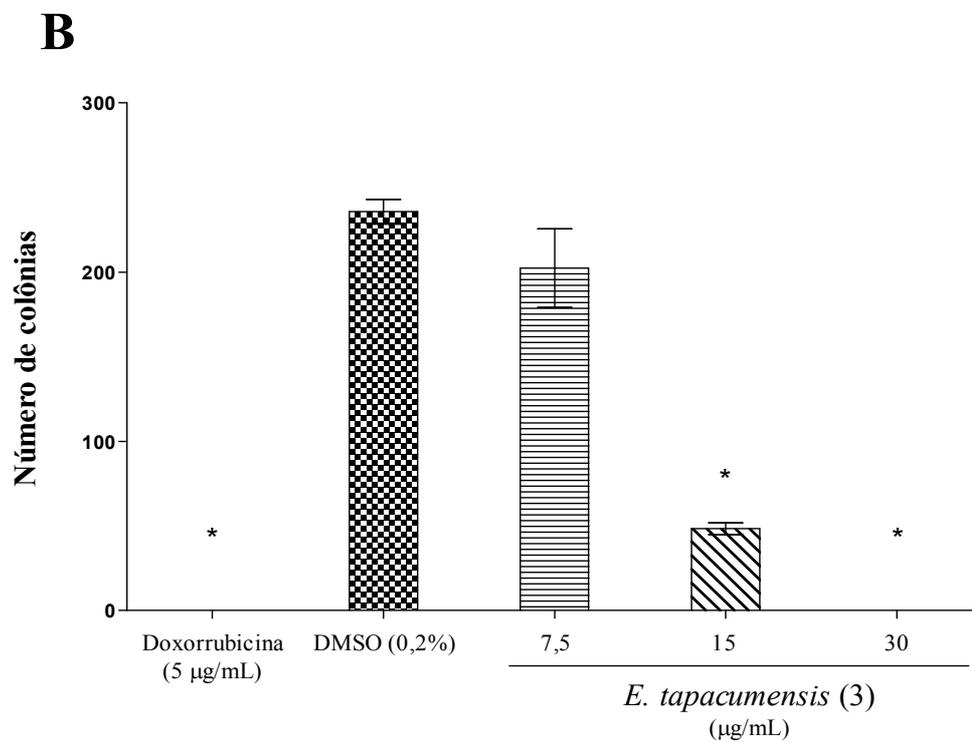
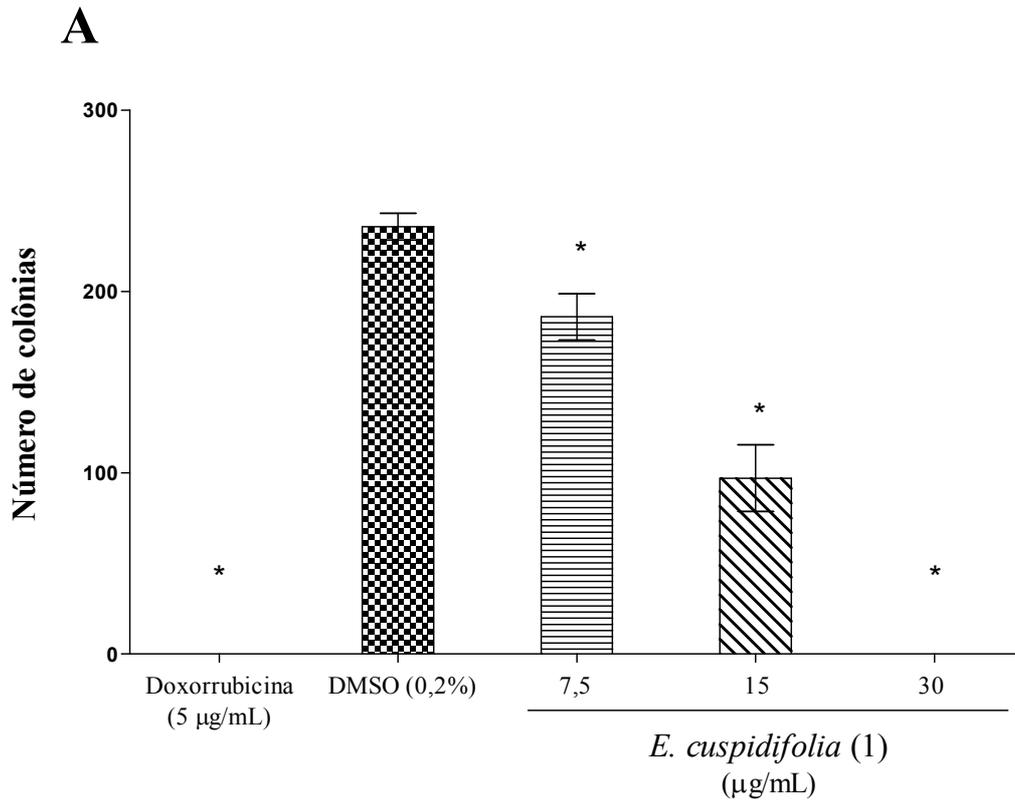


Gráfico 1- Efeito dos óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (A) e *E. tapacumensis* (B) no ensaio clonogênico, após 10 dias de incubação, em concentrações de 7,5, 15 e 30 µg/mL. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA *one way* seguido de teste Tukey.

5.4 – Ensaio de motilidade celular

O efeito inibitório dos óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) (7,5, 15 e 30 µg/mL) é mostrado na figura 8 e 9, respectivamente. Através da análise microscópica, foi possível observar que o tratamento com os óleos essenciais reduziu significativamente ($p < 0,05$) a taxa de migração celular da linhagem HCT 116 somente na maior concentração testada (30 µg/mL) e após 48h de exposição, quando comparado ao tratamento com DMSO (0,2%), sugerindo que esse efeito seja concentração-dependente. O tratamento com Doxorrubicina (5,0 µg/mL) causou redução significativa em ambos os tempos de tratamento testados ($p < 0,05$). Os dados estão representados no gráfico 2A e 2B.

5.5 - Inibição de Metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9)

A atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 foi avaliada por método zimográfico e é mostrada na Figura 7. Analisando os resultados obtidos pode-se concluir que o óleo essencial de *E. tapacumensis* (3) apresentou melhor efeito inibitório frente a MMP-2 e MMP-9, reduzindo a atividade enzimática na concentração de 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$), em ambos os tempos de tratamento. O óleo essencial de *E. cuspidifolia* (1) reduziu a atividade enzimática da MMP-9 somente na maior concentração testada (30 $\mu\text{g/mL}$). Dados representados no Gráfico 3.

O maior percentual de inibição foi observado para o tratamento com o óleo essencial de *E. tapacumensis* (3), no tempo de 48h. Nessas condições, a inibição da atividade enzimática para MMP-2 e MMP-9 foi de 11,64 % ($p < 0,05$) e 7,54 % ($p < 0,05$), respectivamente, na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado com o controle, sem tratamento.

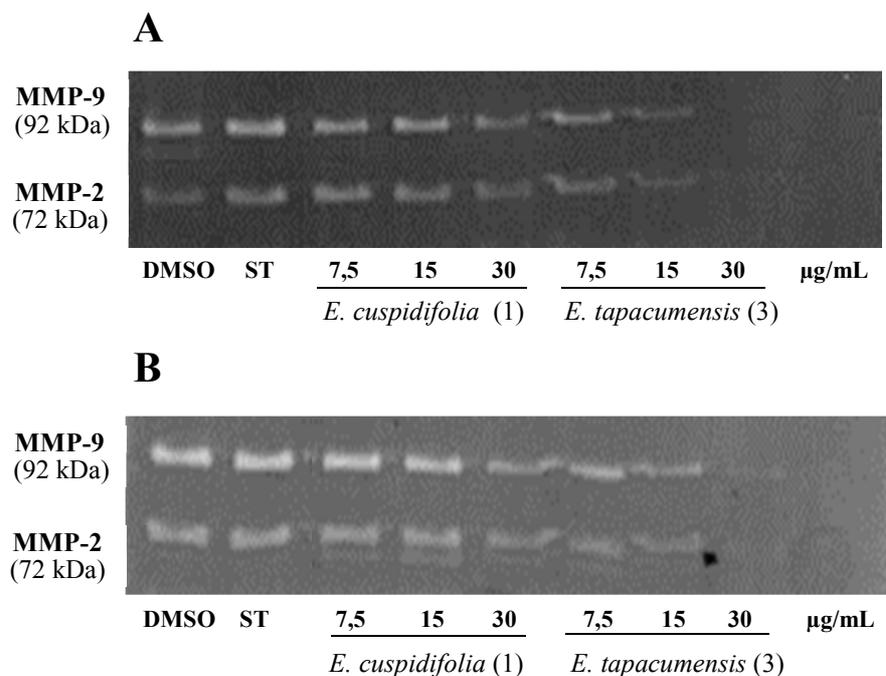


Figura 10- Efeito inibidor dos óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) na atividade de MMP-2 e MMP-9 em células HT1080. A- 24h de tratamento; B- 48h de tratamento; ST- Sem tratamento.

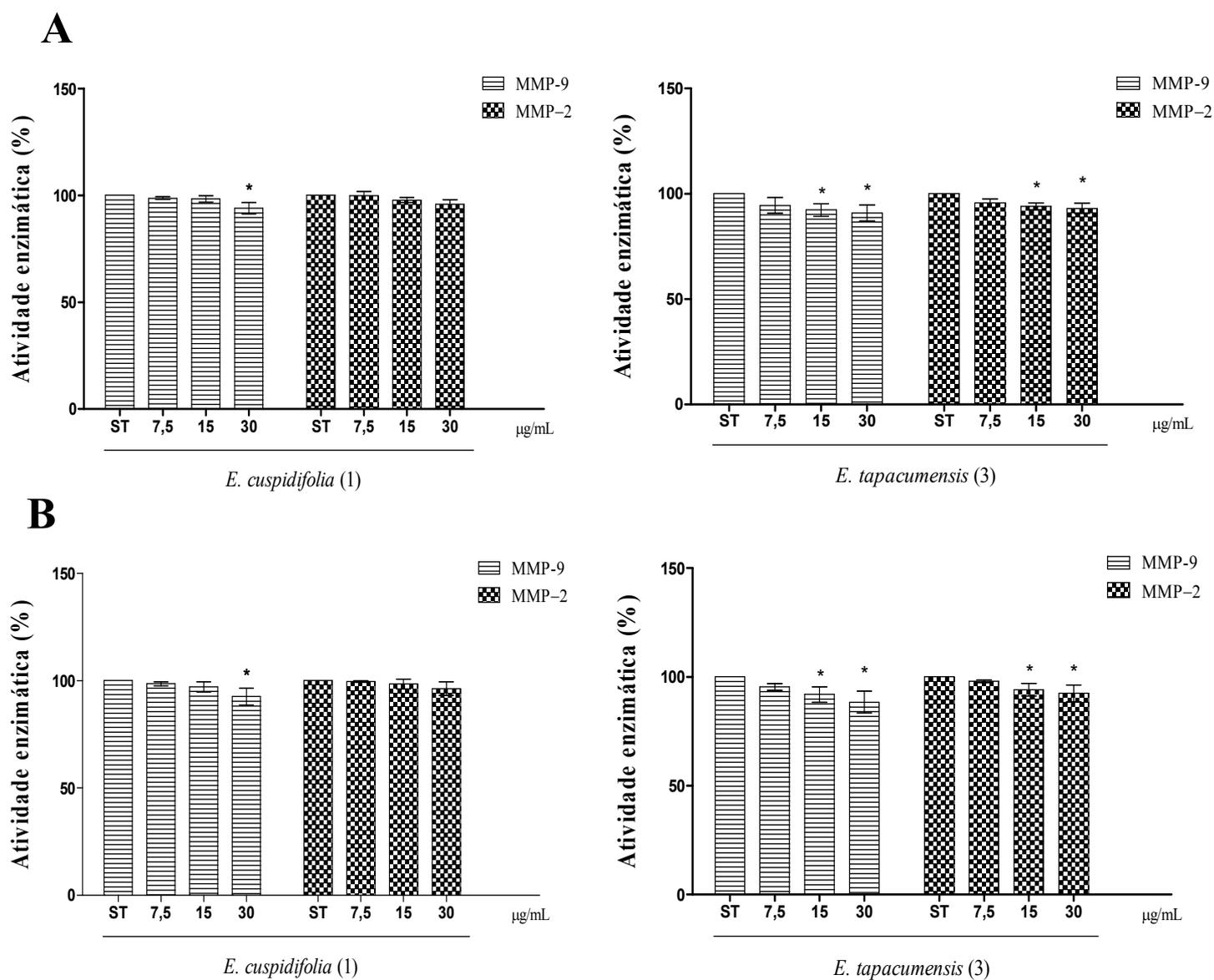


Gráfico 3- Atividade de MMP-2 e MMP-9 em células HT1080, após do tratamento com os óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3). A- 24h de tratamento; B- 48h de tratamento; ST- Sem tratamento. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA *two way* seguido de Bonferroni *posttest*.

5.6 – Avaliação da genotoxicidade

5.6.1- Ensaio do Cometa – pH alcalino e neutro

Os óleos essenciais das espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) (7,5, 15 e 30 µg/mL) foram testados para avaliar a capacidade de causar danos ao DNA, em células não neoplásicas, utilizando a versão em pH alcalino e pH neutro. Para ambos, foi utilizado para a análise comparativa o índice de dano (ID) ao DNA. Tal parâmetro reflete a extensão de DNA lesionado.

O ensaio do cometa alcalino é a versão geralmente mais usada, é capaz de detectar todos os tipos de danos ao DNA (JAYAKUMAR, *et al.*, 2012). Nos resultados obtidos referentes ao cometa alcalino o tratamento com óleo essencial da espécie *E. cuspidifolia* (1), após 3 h de incubação, não foi observado diferença estatística na migração do DNA em nenhuma concentração testada, ou seja não induziu danos ao DNA. No tratamento com o óleo essencial da espécie *E. tapacumensis* (3), somente na maior concentração testada (30 µg/mL) houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no ID, quando comparados ao grupo controle (DMSO 0,2%), o mesmo aconteceu para o controle positivo - Doxorrubicina (10 µg/mL). Dados representados no Gráfico 4-A. Os tipos de dano mais frequentes no ensaio em pH alcalino, após os tratamentos com os óleos essenciais, foram os de grau 0 e 1, exceto para o tratamento com *E. tapacumensis* (3) (30 µg/mL), no qual os danos mais frequentes foram de grau 1 e 2. Quando utilizado doxorrubicina (10 µg/mL), os danos mais frequente foi grau 2 e 3.

O ensaio do cometa em pH neutro permite a detecção de quebras de fitas duplas no DNA (SHARMA, *et al.*, 2011). Os dados estão representados no Gráfico 4-B. Nessas condições, o tratamento com o óleo essencial da espécie *E. cuspidifolia* (1) não causou danos

ao DNA, ou seja, não houve diferença estatística significativa em nenhum dos tratamentos quando comparado ao controle. No entanto, houve diferença significativa ($p < 0,05$) no ID quando usado o óleo essencial de *E. tapacumensis* (3), em todas as concentrações testadas. Após os tratamentos, com os óleos essenciais, os tipos de dano ao DNA mais frequentes foram os de grau 1 e 2, com exceção do tratamento com *E. tapacumensis* (3) (30 µg/mL), onde observou-se maior frequência de grau 2 e 3. Doxorrubicina (10 µg/mL) causou maior frequência de danos grau 2, 3 e 4.

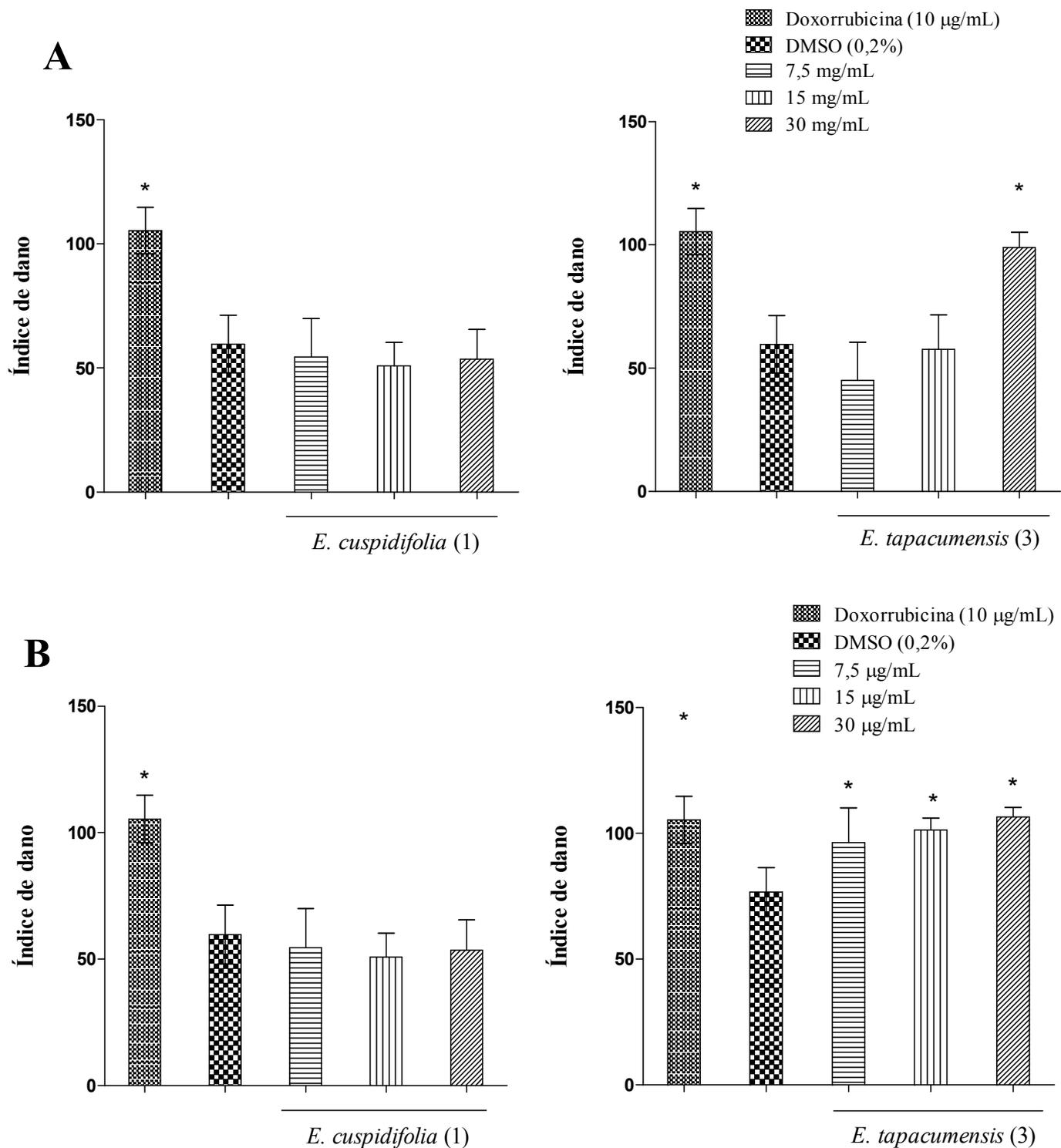


Gráfico 4- Índice de dano ao DNA em células MRC-5, após 3h de tratamento com os óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3). A- Cometa alcalino; B- Cometa neutro. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao DMSO (0,2%) por ANOVA *one way* seguido de teste Tukey.

6- DISCUSSÃO

Produtos naturais apresentam uma diversidade de estruturas, que através das pesquisas científicas, desenvolvida ao longo dos anos, são identificadas com potencial terapêutico e vêm sendo melhoradas para exercer seus efeitos e apresentar melhor atividade. As plantas estão inseridas nesse contexto como uma das principais fontes de diversas estruturas e metabólitos ativos, inclusive com propriedade anticâncer, e que atualmente fazem parte dos tratamentos clínicos disponíveis ou que serviram para o seu desenvolvimento (SALVADOR, *et al.*, 2013).

As pesquisas envolvendo a atividade biológica de óleos essenciais bem como de seus componentes traz um cenário propício para a obtenção de novos produtos, inclusive com atividade antitumoral. O potencial terapêutico de óleos essenciais e seus constituintes têm chamado à atenção de pesquisadores para a sua aplicação anticâncer (BEZERRA, *et al.*, 2009).

Através do método de CG-DIC e CG-EM foi possível identificar 22 componentes no óleo essencial da espécie *E. tapacumensis* (3), onde os componentes majoritário são representados pelos sesquiterpenos óxido de cariofileno (57,46%), α -copaeno (13,67%) e o *cis*-nerolidol (3,81%). Na espécie *E. cuspidifolia* (1), foram identificados 9 constituintes, os componentes majoritários foram óxido de cariofileno (57,46%), α -copaeno (3,75%) e o hepóxido de humuleno II (3,37%).

Diferenças na composição química de óleos essenciais podem ser devido a diversos fatores, como a localização geográfica, estação do ano, condições ambientais, estado nutricional da planta, dentre outros fatores (BADAWY; ABDELGALEIL, 2014). Se tratando do gênero *Eugenia*, Cole *et al.* (2007) descreveram alguns compostos químicos que são

comuns ao gênero *Eugenia*, dentre eles está o α -copaeno, o qual foi encontrado em ambos os óleos essenciais analisados nessa pesquisa. No mesmo estudo citado, foi encontrado que o óleo essencial da espécie *Eugenia zuchowskiae* é constituído em grande maioria de sesquiterpenos.

Nakamura *et al.* (2010) estudaram a composição química do óleo essencial de diferentes espécies de *Eugenia*, e em todas as amostras encontraram sesquiterpenos como os componentes mais abundantes. Nesse mesmo estudo o constituinte majoritário encontrado no óleo essencial da espécie *Eugenia copacabanensis* foi o óxido de cariofileno, assim como o encontrado nos óleos essenciais das espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3), analisados nessa pesquisa. Em ambas as amostras, a constituição destes prevalece a presença de sesquiterpenos, de acordo com o que foi descrito para as outras espécies do gênero *Eugenia*.

Em pesquisa realizada por Wang, *et al.* (2012) onde foi analisado o potencial citotóxico do óleo essencial da espécie *Rosmarinus officinalis* e de três de seus constituintes (1,8-cineol, α -pineno e β -pineno) em linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de ovário (SK-OV-3), carcinoma de ovário (HO-8910) e carcinoma hepatocelular (Bel-7402), os resultados obtidos evidenciaram o potencial citotóxico do constituinte α -pineno e β -pineno, citotóxicos para as três linhagens celulares testadas. Nesse estudo, o potencial citotóxico do óleo essencial foi maior quando comparado aos constituintes, nisso ressalta-se a importância do sinergismo existente entre substâncias, o que pode influenciar os resultados positivos na avaliação do potencial biológico de drogas.

No entanto, é muito difícil atribuir às atividades biológicas de um óleo essencial a um ou mais constituintes químicos, isso porque um óleo essencial contém sempre uma mistura de compostos diferentes. Além dos componentes majoritários, os compostos em menor

quantidade podem ter contribuição significativa para a atividade biológica do óleo essencial (WANG, *et al.*, 2008).

A triagem de drogas anticâncer em modelos *in vitro* tem sido um importante caminho na pesquisa do câncer. Assim, um método eficaz de triagem de drogas anticâncer é um ponto de partida e um passo decisivo na pesquisa de futuros medicamentos inovadores (CHEN, *et al.*, 2009).

Em geral, o ensaio para avaliação da capacidade hemolítica *in vitro* é utilizado como método de triagem tóxica, estimando o dano eritrocitário que poderá induzir *in vivo* (APARICIO, *et al.*, 2005). Tal parâmetro vem sendo utilizado pela comunidade científica para avaliação toxicológica de diferentes plantas (OLIVEIRA, *et al.*, 2009). Neste ensaio, a maioria dos óleos essenciais das espécies de *Eugenia* analisados não causaram hemólise em eritrócitos de camundongos, quando testadas em concentração única (2000 µg/mL), aquelas amostras que apresentaram potencial hemolítico os valores de CE₅₀ variaram entre 98,42 µg/mL (84,10- 115,2) a 389,2 µg/mL (309,3- 489,8). Dados representados na Tabela 5.

Os resultados encontrados para os ensaios citotóxicos mostram que há diferença na sensibilidade das linhagens de células neoplásicas aos óleos essenciais testados (Tabela 4). Os óleos essenciais foram ativos para diferentes tipos celulares, com um potencial para a linhagem ES-2, com valores de CI₅₀ entre 4,55 a 10,54 µg/mL. Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo, e os valores de CI₅₀ entre 0,03 a 0,7 µg/mL foram obtidos nas linhagens tumorais testadas nessa pesquisa para este quimioterápico. Esse é um medicamento antineoplásico, bastante utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer (AGUDELO, *et al.*, 2014; MA; MUMPER, 2013).

Os óleos de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) foram considerados mais ativos para as linhagens celulares com valores de CI₅₀ de 4,69 a 24,35 µg/mL e 6,22 a 26,17 µg/mL,

respectivamente. As demais amostras com valores de 4,52 – 32,63 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CI_{50} para a linhagem não tumoral (MRC-5) ficaram entre 25,51 a 38,38 $\mu\text{g/mL}$. Essas duas espécies citadas foram mais ativas para as linhagens HCT 116 e ES-2. A partir destes valores encontrados, buscou-se avaliar o efeito anticâncer das amostras de óleo essencial das espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) na linhagem tumoral de colorretal (HCT 116).

O câncer de colorretal é um dos mais frequentes tipos de câncer diagnosticado e também de mortes, em todo o mundo. Nos países desenvolvidos apresenta a segunda maior causa de morte por câncer, sendo considerado um problema de saúde pública (DIAZ, *et al.*, 2012; ZHANG, *et al.*, 2014). Segundo o INCA, o câncer de cólon e reto está entre o mais incidentes na população brasileira, para ambos os sexos, sendo previstos aproximadamente 33 mil casos novos para o ano de 2014, perdendo apenas para o tipo melanoma (182 mil), próstata (69 mil) e mama (57 mil). Na Região Norte, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto é o quarto tipo de câncer mais frequente (4,48/ 100 mil) (INCA, 2014a).

Assim, escolheu-se investigar o potencial anticâncer das amostras de óleo essencial das espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) na linhagem celular HCT 116. Nesta linhagem a CI_{50} obtida, através do ensaio alamar blue, foi CI_{50} 15,25 $\mu\text{g/mL}$ (12,98- 17,93) e CI_{50} 12,37 $\mu\text{g/mL}$ (9,71 – 15,76), respectivamente. Quintans *et al.* (2013), utilizando HCT 116, obtiveram valores de CI_{50} entre 22,2 a 27, 6 $\mu\text{g/mL}$, de três amostras obtidas do óleos essencial de *Xylopi* *laevigata*. Confrontando com os resultados obtidos na presente pesquisa, na mesma linhagem celular, foram obtidos valores menores de CI_{50} para as duas amostras que se escolheu estudar. Suffness; Pezzuto (2009) relataram que amostras, como extratos e óleos, com valores de CI_{50} inferiores a 30 $\mu\text{g/mL}$, em linhagens celulares neoplásicas, podem ser consideradas como promissoras para o estudo e desenvolvimento de drogas anticâncer.

Além disso, a citotoxicidade na linhagem neoplásica HCT 116 foi superior a encontrada para a linhagem celular não neoplásica, CI_{50} 25,51 e 36,12 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para os óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3). Vale ressaltar, que ambos os óleos não causaram hemólise em eritrócitos de camundongos. Sugere-se que a citotoxicidade não esteja relacionada à ruptura de membrana, e outro mecanismo citotóxico seja responsável por essa ação.

Devido ao grande número de constituintes químicos presentes nos óleos essenciais, estes parecem não ter alvos celulares específicos, e a característica lipofílica garante uma alta permeabilidade. A citotoxicidade geralmente está relacionada a danos a membrana, pois esses rompem a bicamada lipídica, afetando as diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos (BAKKALLI, *et al.*, 2008). No entanto, algumas pesquisas têm procurado identificar os mecanismos de ação relacionados à atividade antitumoral de óleos essenciais, e alguns resultados indicam a participação de vias apoptóticas nos perfis de toxicidade de óleos essenciais contra células tumorais (DUYMUS, *et al.*, 2014; PATHANIA, *et al.*, 2013). Tal suposição poderia indicar como os óleos do gênero *Eugenia* analisados, causaram citotoxicidade para as linhagens celulares testadas, sem provocar hemólise.

Mesmo com todo o potencial terapêutico descrito para óleos essenciais do gênero *Eugenia*, poucas pesquisas buscam avaliar seu potencial anticâncer. A avaliação da atividade citotóxica de produtos naturais, como óleos essenciais, pode ser observada em numerosas pesquisas, utilizando diferentes tipos celulares. Nos resultados obtidos por Lone *et al.* (2014), utilizando o óleo essencial de diferentes partes da planta *Senecio graciliflorus*, foi encontrado potencial citotóxico em uma linhagem celular humana de pulmão (A-549). Para o óleo essencial obtido das folhas foi encontrado o valor de CI_{50} $19,1 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ e para o obtido da raiz CI_{50} $21,3 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$.

A proliferação descontrolada é uma característica universal para todas as células tumorais. A investigação do mecanismo de controle do crescimento celular contribui para a compreensão do processo de carcinogênese e para a identificação de compostos com uma possível ação antitumoral específica. É fundamental identificar compostos que reduzam a taxa de proliferação celular, para posteriormente investigar o caminho anticâncer de ação de drogas (JAIN, R.; JAIN, S., 2011). Os resultados obtidos com os óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) evidenciam o seu potencial em reduzir a proliferação de algumas linhagens de células tumorais, reforçando a importância de investigar essa ação biológica.

O câncer é considerado o problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, entre os quais o câncer de cólon e reto está entre os mais incidentes. Diversas pesquisas têm sido feitas no intuito de melhorar e tornar mais eficazes os tratamentos para esta doença. A este respeito, produtos naturais continuam a ser a mais promissora fonte de novas drogas para o câncer (RAVIKUMAR; FREDIMOSSES; GNANADESIGAN, 2012).

Dentre os ensaios para avaliar mecanismos de ação de drogas está o ensaio clonogênico, o qual é amplamente utilizado para examinar efeitos de drogas com potencial aplicação na clínica. Este ensaio determina a capacidade de uma célula sobreviver e a proliferar indefinidamente, mantendo assim a capacidade reprodutiva para formar uma grande colônia (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005). De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio (Gráfico 1), o óleo essencial de *E. cuspidifolia* (1) reduziu o número de colônias ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas e *E. tapacumensis* (3) em 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado ao tratamento com DMSO (0,2%) - essa concentração de DMSO não tem influência sobre a proliferação celular (BONCLER, *et al.*, 2014). Permite-se dizer que na maior concentração utilizada dos óleos essenciais (30 $\mu\text{g/mL}$), pode ter ocorrido uma resposta

citotóxica, ou seja, o tratamento pode ter causado morte celular e não a total inibição no número de colônias. No entanto, ressalta-se este resultado, onde mesmo em um longo período de tratamento, como nos 10 dias de realização desse ensaio, mantém-se o efeito de citotoxicidade dos óleos essenciais.

Em pesquisa realizada por Toyang *et al.*, (2013), na qual a partir das folhas da espécie *Vernonia guineensis* foram isolados dois sesquiterpenos, Vernopicrina e Vernomelitsina, foi encontrado como resultado que na concentração de 500nM essas duas substâncias reduziram o número de colônias na linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (PC-3), em um período de exposição de nove dias. Esse dado, quando correlacionado ao resultado obtido para os óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3), gera expectativas quanto ao efeito promissor anticâncer de sesquiterpenos, onde para as duas espécies estudadas foram a classe de constituintes químicos identificados em maior abundância.

Entre os mecanismos do desenvolvimento do câncer, estão os complexos processos de adesão, invasão e migração da célula neoplásica. A invasão celular requer que as células do tumor penetrem a membrana basal antes de alcançarem a circulação sanguínea. A migração celular é também uma importante propriedade, onde a célula tumoral migra do local primário para um órgão secundário (WOO, *et al.*, 2011). Segundo, Lampugnani (1999) o ensaio de motilidade celular, utilizado nesse estudo, é comumente empregado para estudar a migração celular. Quando realizada a descontinuidade da monocamada de células, o crescimento ocorre através de uma combinação de eventos, como proliferação e migração (YARROW, *et al.*, 2004). Segundo Rodriguez; Wu; Guan, (2005), um ensaio realizado em logo prazo (>24h), pode não distinguir efeitos na proliferação da migração celular.

A migração das células tumorais é um processo crítico de invasão permitindo a adaptação dos tumores primários para a metástase (HE, *et al.*, 2014). O efeito do tratamento

dos óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3), mostrado no Gráfico 2A e 2B, respectivamente, demonstra que o tratamento com os óleos essenciais reduziu a migração celular somente quando utilizada a maior concentração testada (30 µg/mL), no tempo de tratamento de 48 h. Boa correlação é feita com relação ao potencial existente nos óleos essenciais e seus constituintes, como descrito por Yin, et al., (2013) que isolaram a substância Z-ligustilida do óleo essencial da espécie vegetal *Angelica sinensis* e mostraram a redução na migração das células T98G, uma linhagem celular de glioblastoma, utilizando o mesmo modelo experimental. Nesta pesquisa a redução da migração celular foi observada na concentração de 5 µM, após 8 horas de tratamento. Este resultado pode indicar que componentes existentes nos óleos essenciais de *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3) influenciam na taxa de migração celular, pois os dois óleos analisados reduziram a migração das células da linhagem HCT 116.

As altas taxas de mortalidade do câncer em sua grande parte estão relacionadas à capacidade invasiva, ocasionado metastases de tumores, o que contribui em grande parte para esse cenário. A inibição desses processos representa uma abordagem significativa para reduzir o número de mortes de pacientes com câncer (TAKAHASHI, et al., 2013). A invasão de células tumorais ocorre através de múltiplos processos, que envolve interação das células tumorais e a matrix extracelular onde se encontram. Entre as proteases que degradam a matrix extracelular, muita atenção tem sido dada a família das MMPs, especialmente a MMP-2 e MMP-9, pois são correlacionados níveis elevados destas enzimas em células de câncer com fenótipo invasor (TAKAHASHI, et al., 2013).

A avaliação da atividade enzimática de MMPs por método zimográfico evidenciou o potencial inibidor dos óleos essenciais das espécies *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3), frente as enzimas MMP-2 e MMP-9. Essa técnica é amplamente utilizada para estudar as enzimas que degradam a matriz extracelular, obtidas de diferentes sistemas biológicos, como

tecidos e cultura de células (KUPAI, *et al.*, 2010). É particularmente útil para a avaliação dos dois membros principais da família das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), devido a potente atividade de degradar a gelatina (TOTH, *et al.*, 2012).

Células da linhagem HT1080 secretam MMP-2 e MMP-9, as quais desempenham um importante papel no câncer metastático. Inibidores de MMPs têm sido descritos como potentes candidatos terapêuticos a diversas patologias, como o câncer (KIM, *et al.*, 2006; TAKAHASHI, *et al.*, 2013). No presente estudo, o óleo essencial da espécie vegetal *E. tapacumensis* (3), na concentração de 15 e 30 µg/mL, reduziu a atividade enzimática das MMPs analisadas (MMP-2 e MMP-9), nos tempos de tratamento 24 e 48 horas, resultado com valor significativo de $p < 0,05$. O óleo essencial da espécie *E. cuspidifolia* (1), reduziu a atividade enzimática de MMP-9 somente quando utilizado a maior concentração (30 µg/mL), em ambos os tempos analisados. O resultado do ensaio é mostrado na Figura 7, e os dados representados no Gráfico 3.

O resultado obtido pode sugerir alvos específicos para estudos futuros, inclusive alvos enzimáticos, como as MMPs, principalmente para MMP-2 que degrada colágeno tipo IV, um dos maiores componentes da membrana basal, resultando na promoção da invasão do tumor e metástases. Quando essa enzima é inibida, a capacidade de invasão é suprimida (LEE, *et al.*, 2007). O óleo essencial de *E. tapacumensis* inibiu a atividade de MMP-2 e MMP-9.

Migração de células tumorais é um dos alvos de investigação como causa básica no processo de metástase do câncer (PALMER, *et al.*, 2011). A descoberta de novos produtos naturais que possam bloquear o crescimento do câncer bem como processos de migração está entre os objetivos principais dos pesquisadores de câncer (NGUYEN, *et al.*, 2013). Avaliar apenas a inibição da motilidade celular e não considerar outros sinais celulares pode superestimar a atividade farmacológica de compostos (HULKOWER; HERBER, 2011). Por esse motivo, investigou-se o potencial inibitório de MMPs, através do qual se buscou

correlacionar dados para a maior confiabilidade dos resultados obtidos. Desse modo, considerando os resultados com o óleo essencial da espécie *E. tapacumensis* (3), nos ensaios de motilidade celular e inibição de MMPs, pode-se gerar expectativas positivas a respeito de perspectivas futuras para pesquisa anticâncer com esse produto natural.

Apesar da crença de que os produtos naturais são seguros para uso humano, os estudos têm demonstrado que as plantas podem ser potencialmente tóxicas para a saúde humana, causando efeitos deletérios, inclusive mutagênicos e carcinogênicos (HERNANDES, *et al.*, 2014). Por esse motivo, os efeitos benéficos de produtos naturais precisam ser correlacionados com a avaliação toxicológica, a fim de verificar os níveis de segurança no seu uso, o que deve ser baseado em evidências científicas, incluindo diferentes testes bem estabelecidos na avaliação dos perfis genotóxicos. Os ensaios de genotoxicidade são realizados a fim de detectar compostos que possuam capacidade de interagir com o DNA (DEMMA, *et al.*, 2009; KAMDEM, *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, o ensaio do cometa tem sido descrito como uma das técnicas mais importantes para pesquisas de genotoxicidade, principalmente por ser uma técnica rápida, simples e sensível (KUMARAVEL; JHA, 2006). Este ensaio em condições de pH alcalino (pH>13), versão mais usada, detecta todos os possíveis tipos de danos ao DNA, ou seja, não há especificidade e não implica o tipo de dano induzido e para distinguir as quebras de fitas duplas a versão em pH neutro tem sido utilizada. Essa versão, pH neutro (pH 8-9), preserva a estrutura de cadeia dupla, caracterizando especificidade ao ensaio (SHARMA, *et al.*, 2011).

Utilizando o ensaio do cometa pH alcalino, somente o tratamento com o óleo essencial *E. tapacumensis* (3) na concentração de 30 µg/mL causou diferença significativa no ID, quando comparado ao tratamento controle- DMSO (0,2%), assim como o tratamento com Doxorubicina (10 µg/mL), em linhagem de células não neoplásicas. Os demais tratamentos, assim como para o óleo essencial da espécie *E. cuspidifolia* (1) foram considerados

estatisticamente iguais ao controle DMSO (0,2%) (Gráfico 4-A), quando comparado o ID, indicando que não houve dano ao DNA.

O ensaio do cometa em condições neutras permite a detecção de quebras de fita dupla de DNA, o que tem consequência na instabilidade do genoma e carcinogênese (SHARMA, *et al.*, 2011). Nessa versão, o óleo essencial de *E. cuspidifolia* (1), não causou dano ao DNA, não houve diferença significativa no ID entre os tratamentos com essa espécie, quando comparado ao controle DMSO (0,2%). No entanto, o tratamento com óleo essencial de *E. tapacumensis* (3) o ID foi estatisticamente diferente em todas as concentrações testadas, (Gráfico 4-B) evidenciando que essa amostra interage com o DNA, causando quebras de fita dupla. Esse tipo de dano é considerado biologicamente mais importante, principalmente por sua estreita relação com danos/ deformidades cromossômicas, o que está relacionado com a morte celular (VAN GENT; HOEIJMARKES; KANAAR, 2001).

Algumas pesquisas demonstram a genotoxicidade de óleos essenciais como a realizada por Sinha, *et al.* (2014) na qual os óleos essenciais obtidos das espécies *Cymbopogon martini* (1000 µg/mL), *Cymbopogon winterianus* (1000 µg/mL), *Cymbopogon citratus* (100 µg/mL) causaram danos ao DNA de linfócitos humanos. Na presente pesquisa o óleo essencial de *E. tapacumensis* (3) apresentou efeito genotóxico, assim como a pesquisa realizada com o constituinte químico (Eugenol) isolado da espécie *Eugenia caryophyllata*, o qual causou danos ao DNA quando testado na concentração de 50µM, em fibroblasto humano (VH10), utilizando o mesmo modelo experimental (SLAMENOVÁ, *et al.* 2009).

Os efeitos genotóxicos de drogas podem ser biologicamente relevantes, como uma alternativa para matar células tumorais. A presença desse efeito sugere que a citotoxicidade do óleo essencial está relacionada a danos ao DNA. No entanto, esse efeito tem que ser avaliado cuidadosamente, para garantir a segurança do uso de drogas (QUINTANS, *et al.*,

2013). Os resultados obtidos no ensaio do cometa, o qual foi realizado em linhagem celular não neoplásica, ressaltam a importância de utilizar com cautela produtos naturais, pois estes podem causar danos irreversíveis, principalmente quando utilizados em longo prazo. É necessário estudar minuciosamente concentrações que possam garantir os efeitos biológicos e terapêuticos, sem causar efeitos tóxicos consideráveis, para assim garantir a eficácia e segurança de produto natural.

7- CONCLUSÃO

Existe potencial citotóxico, para linhagens tumorais, nos óleos essenciais de espécies do gênero *Eugenia*. As espécies com melhor efeito citotóxico foram *E. cuspidifolia* (1) e *E. tapacumensis* (3), e foram identificados sesquiterpenos como o principal classe dos constituintes químicos, nos ensaios biológicos apresentaram efeito concentração-dependente, onde:

- Reduziram o número de colônias, na linhagem celular HCT 116;
- Inibiram a migração celular das células HCT 116;
- Inibiram a atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9, de HT1080;
- *E.cuspidifolia* (1) não apresentou dano significativo ao DNA não sendo genotóxica nas concentrações testadas em células não neoplásicas, no entanto o óleo essencial de *E. tapacumensis* (3) causou dano, principalmente quebras de fita dupla.

Assim, os óleos essenciais de *Eugenia cuspidifolia* e *Eugenia tapacumensis* podem ser considerados uma fonte de compostos, os quais poderão ser investigados quanto ao seu potencial anticâncer (através de outros mecanismos), em estudos futuros, principalmente em pesquisas envolvendo o câncer de colorretal - linhagem celular utilizada nessa pesquisa. Utilizando mais ensaios biológicos, poderão ser identificados os componentes responsáveis por tal atividade e assim, determinar níveis seguros de sua utilização e eficácia terapêutica para essa linha de pesquisa, estudos posteriores poderão afirmar se o dano induzido no DNA de células MRC-5 é reversível ou não, de maneira que possa-se assegurar a segurança do óleo essencial de *E. tapacumensis*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography, massspectroscopy*. 4 ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 407–426, 2010.
- AGUDELO, D. *et al.* Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 144–150, 2014.
- AHMED, S.A. *et al.* A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.
- ALMEIDA, M.R. *et al.* Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 664-672, 2012.
- American cancer society. Cancer Statistics Report: Deaths Down 20% in 2 Decades. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/news/news/cancer-statistics-report-deaths-down-20-percent-in-2-decades>>. Acesso em: 26 março 2014.
- APARICIO, R.M. *et al.* *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1063–1067, 2005.
- BADAWY, M.E.I.; ABDELGALEIL, S.A.M. Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 776- 782, 2014.
- BAG, A. *et al.* *In vitro* antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**, v. 167, p. 352- 357, 2012.
- BAKKALLI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446- 475, 2008.
- BALBANI, A.P.S.; SILVA, D.H.S.; MONTOVANI, J.C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, p. 461-473, 2009.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.
- BEZERRA, D.P. *et al.* Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 1224- 1230, 2009.

- BLÀZQUEZ, C. *et al.* Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. **Cancer Research**, v. 68, p. 1945-1952, 2008.
- BODAS, R. *et al.* Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 78– 93, 2012.
- BONCLER, M. *et al.* Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, p. 9–16, 2014.
- BOSTANCIOĞLU, R.B. *et al.* Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of *Origanum onites* L. essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2002- 2008, 2012.
- BRANDÃO, H.N. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.
- BRASIL. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128p.
- BRITTO, A.C.S. *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Medica**, v. 78, p. 409-414, 2012.
- CHACON, D.R. *et al.* Absence of genotoxic and anti-genotoxic effects of a standardized extract of the medicinal plant *Solanum melongena* on peripheral blood and bone marrow cells of *Wistar* rats. **Cytologia**, v.67, p. 417-422, 2002.
- CHEN, Z. *et al.* Screen anticancer drug in vitro using resonance light scattering technique. **Talanta**, v. 77, p. 1365–1369, 2009.
- CINGI, M.R. *et al.* Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxicology in vitro**, v. 5, p. 119-125, 1991.
- COLE, R.A. *et al.* Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 877-886, 2007.
- COSTA-LOTUFO, L.V. *et al.* A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 47-58, 2010.
- CRAGG, G.A.; NEWMAN, D.J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, p. 7–24, 2005.
- DA ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 1, p. 364–369, 2001.
- DE CARVALHO JUNIOR, A.R. *et al.* Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (myrtaceae). **Química Nova**, p. 1-6, 2014.

DEMMA, J. *et al.* Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 136–142, 2009.

DIAO, W. *et al.* Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, p. 109 e 116, 2014.

DIAZ, L.A. Jr. *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. **Nature**, v. 486, p. 537–540, 2012.

DUYMUS, H.G. *et al.* The cytotoxic activity of *Vitex agnus castus* L. essential oils and their biochemical mechanisms. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 33–42, 2014.

ELISABETSKY, E.; SHANLEY, P. Ethnopharmacology in the brazilian amazon. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, p. 201-214, 1994.

GALIS, Z. *et al.* Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. **Circulation Research**, v. 75, p. 181- 189, 1994.

GAZZANO-SANTORO, H. *et al.* A non-radioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody. **Journal of Immunological Methods**, v. 202, p. 163- 171, 1997.

GLOECKNER, H. *et al.* Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, p. 131–138, 2001.

GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G. Pratical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research**, v. 455, p. 21-28, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646- 674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HE, Z. *et al.* Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity. **Phytomedicine**, 2014.

HERNANDES, L.C. *et al.* *In vivo* assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. **Food Research International**, v. 62, p. 121–127, 2014.

HOUGHTON, P.J. *et al.* Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 391–400, 2007.

HULKOWER, K.I; HERBER, R.L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery, **Pharmaceutics**, v. 3, p. 107-124, 2011.

HWANG, Y.P. *et al.* Suppression of PMA-induced tumor cell invasion by dihydroartemisinin via inhibition of PKC α /Raf/MAPKs and NF- κ B/AP-1-dependent mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 1714–1726, 2010.

INCA. **O que é o câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> Acesso em: 30 março 2014.

_____. **Estimativas 2014- Incidência de câncer no Brasil.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2>> Acesso em: 30 março 2014a.

_____. **Tratamento do câncer.** Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>> Acesso em: 30 março 2014b.

ITHARAT, A. *et al.* *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 33–38, 2004.

JAIN, R.; JAIN, S.K. Screening of *in vitro* cytotoxic activity of some medicinal plants used traditionally to treat cancer in Chhattisgarh state, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S147-S150, 2011.

JAYAKUMAR, S. *et al.* The potential value of the neutral comet assay and the expression of genes associated with DNA damage in assessing the radiosensitivity of tumor cells. **Mutation Research**, v. 748, p. 52– 59, 2012.

KAJI, M. *et al.* Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in lung cancer studied using film *in situ* zymography stamp method. **Lung Cancer**, v. 39, p. 125-130, 2003.

KAMDEM, J.P. *et al.* Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 26- 34, 2013.

KAUR, R. *et al.* Plants as a source of anticancer agents. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 1, p. 119-124, 2011.

KHAMISAN, S. *et al.* Antimalarial, anticancer, antimicrobial activities and chemical constituents of essential oil from the aerial parts of *Cyperus kyllingia* Endl. **Records of Natural Products**, v.5, p. 324 – 327, 2011.

KHAZIR, J. *et al.* Role of plants in anticancer drug discovery. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 173–181, 2014.

KIM, M. *et al.* Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. **Life Sciences**, v. 79, p. 1436 – 1443, 2006.

KOCH, C. *et al.* Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. **Phytotherapy**, v. 15, p. 71 – 78, 2008.

KUMAR, A. *et al.* An essential oil and its major constituent isomenthyl acetate induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukemia HL-60 cells. **Chemo-Biological Interactions**, v. 171, p. 332–334, 2008.

KUMARAVEL, T.S.; JHA, A.N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research**, v. 605, p. 7–16, 2006.

KUPAI, K. *et al.* Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, p. 205–209, 2010.

LAMPUGNANI, M.G. Cell migration into a wounded area *in vitro*. **Methods in Molecular Biology**, v. 96, p. 177-182, 1999.

LEVICAR, N.; NUTTALL, R.K.; LAH, T.T. Proteases in brain tumour progression. **Acta Neurochirurgica**, v. 145, p. 825-838, 2003.

LEE, S. *et al.* Inhibitory effect of obovatal on the migration and invasion of HT1080 cells via the inhibition of MMP-2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 4085–4090, 2007.

LIANG, C.; PARK, A.Y.; GUAN, J. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, p. 329-333, 2007.

LONE, S.H. *et al.* Essential oil composition of *Senecio graciliflorus* DC: Comparative analysis of different parts and evaluation of antioxidant and cytotoxic activities. **Phytomedicine**, p. 1-7, 2014.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUKASZEWICZ-ZAJAC, M.; MROCZKO, B.; SZMITKOWSKI, M. Gastric cancer- The role of matrix metalloproteinases in tumor progression. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 1725–1730, 2011.

LUNGUINHO, D.M. **Estudos dos efeitos antitumorais e toxicológicos do óleo essencial das folhas de *Xylopiá frutescens* Aubl. (ANNONACEAE)**. 2012. 133f. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, 2012.

MA, P.; MUMPER, R.J. Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review. **Nano Today**, v. 8, p. 313- 331, 2013.

MAISTROA, E.L.; CARVALHOA, J.C.T. ; MANTOVANIB, M.S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 337–342, 2004.

MARTINS, M.R. *et al.* Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 485- 492, 2014.

MAZINE, F. F.; SOUZA, V. C. A new species of *Eugenia* (Myrtaceae) from north-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 158, p. 775–777, 2008.

- MEHNDIRATTA, S. *et al.* A review on plants a useful source of anti-cancer drugs. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, p. 264–271, 2011.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105–111, 2001.
- MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R.E. Clonogenic cell survival assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 21–8, 2005.
- NAKAMURA, M.J. *et al.* Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1170–1175, 2010.
- NAKAYAMA, G.R. *et al.* Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, p. 205–208, 1997.
- NEERGHEEN, V.S. *et al.* Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. **Toxicology**, v. 278, p. 229–241, 2010.
- NOBILI, S. *et al.* Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 365–378, 2009.
- OGUNWANDE, I.A. *et al.* Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 147–152, 2005.
- OLIVEIRA, V.M.A. *et al.* *In vitro* screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amazonia**, vol. 3, p. 973–980, 2009.
- PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in-vitro*. **International Journal of Oncology**, v. 3, p. 473–476, 1993.
- PALMER, T.D. *et al.* Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 568–581, 2011.
- PATHANIA, A.S. *et al.* Disruption of the PI3K/AKT/mTOR signaling cascade and induction of apoptosis in HL-60 cells by an essential oil from *Monarda citriodora*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 246–254, 2013.
- PLUMB, J.A. Cell Sensitivity Assays: Clonogenic Assay. **Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**, v. 88, p. 159–164, 2004.
- QUINTANS, J.S.S. *et al.* Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopia laevigata*. **Planta Medica**, v. 79, p. 123–130, 2013.
- RAUSCH, O. High content cellular screening. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 316–320, 2006.
- RAVIKUMAR, S.; FREDIMOSSES, M.; GNANADESIGAN, M. Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 92–96, 2012.

- REDDY, L. *et al.* Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99, p. 1–13, 2003.
- RODRIGUEZ, L.G.; WU, X.; GUAN, J.L. Wound-healing assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 294, p. 23–29, 2005.
- ROMAGNOLO, M.B.; SOUZA, M.C. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 529-548, 2006.
- ROMERO-JIMÉNEZ, M. *et al.* Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicine herbs. **Mutation Research**, v.585, p. 147-155, 2005.
- SALAZAR, A.T. *et al.* Anti-inflammatory and anti-cancer activities of essential oils and their biological constituents. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 49, p. 93–95, 2011.
- SALVADOR, J.A.R. *et al.* Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 324 – 374, 2013.
- SANTOS, K.K.A. *et al.* Anti- *Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 130–132, 2012.
- Screening Services.** Disponível em <<http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>>. Acesso em: 30 março 2014.
- SHAH UNNATI, *et al.* Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, p. 16–23, 2013.
- SHARMA, A. *et al.* Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research**, v. 721, p. 142–146, 2011.
- SHARMA, P.R. *et al.* Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, p. 160–168, 2009.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, p. 11- 30, 2013.
- SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.
- SINGH, N.P. *et al.* Simple Technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- SINHA, S. *et al.* Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 71–77, 2014.
- SLAMENOVÁ, D. *et al.* Investigation of anti-oxidative, cytotoxic, DNA-damaging and DNA-protective effects of plant volatiles eugenol and borneol in human-derived HepG2, Caco-2 and VH10 cell lines. **Mutation Research**, v. 677, p. 46–52, 2009.

STEFANELLO, M.E.A; PASCOAL, A.C.R.F; SALVADOR, M.J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 73-94, 2011.

SUFFNESS, M., PEZZUTO, J.M. Assay related to cancer drug discovery. In: Hostettman K. (ed.) **Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity**. London: Academic Press; 2009, p. 71-133.

SUGGIT, M.; BIBBY, M.C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target driven approaches. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 971-981, 2005.

SYLVESTRE, M. *et al.* Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 99–102, 2006.

TADDEI, M.L. *et al.* Microenvironment and tumor cell plasticity: An easy way out. **Cancer Letters**, v. 341, p. 80–96, 2013.

TAKAHASHI, N.; TAKEDA, K.; IMAI, M. Inhibitory effects of p-dodecylaminophenol on the invasiveness of human fibrosarcoma cell line HT1080. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6015–6021, 2013.

TOTH, M.; SOHAIL, A.; FRIDMAN, R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. **Methods in Molecular Biology**, v. 878, p. 121-135, 2012.

TOYANG, N.J. *et al.* Cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 552–556, 2013.

TRAJANO, V.N. *et al.* Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* Thumb leaves on coalho cheese contaminating microorganisms. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 1001-1006, 2010.

VALENTE, J. *et al.* *Margotia gummifera* essential oil as a source of anti-inflammatory drugs. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 86– 91, 2013.

VAN GENT, D.C.; HOEIJMAKERS, J.H.; KANAAR, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nature Review Genetics**, v. 2, p. 196–206, 2001.

VANDEBROEK, I. *et al.* A comparison of traditional healers' medicinal plant knowledge in the Bolivian Andes and Amazon. **Social Science and Medicine**, v. 59, p. 837–849, 2004.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, p. 1-7, 2006.

VERMA, R.S.; PADALIA, R.C.; CHAUHAN, A. Chemical composition variability of essential oil during ontogenesis of *Daucus carota* L. subsp. sativus (Hoffm.) Arcang. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 809- 814, 2014.

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

WANG, B. *et al.* The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1141–1151, 2011.

_____, W. *et al.* Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**, v. 17, p. 2704-2713, 2012.

_____, W. *et al.* Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1019–1022, 2008.

_____, X. *et al.* The regulatory roles of miRNA and methylation on oncogene and tumor suppressor gene expression in pancreatic cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, p. 51–57, 2012.

WATTANAPLTAYAKUL, S.K. *et al.* Screen of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against Doxorubicin toxicity. **Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 80–87, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292%3Acancer&catid=1866%3Ahsd0201a-cancer-home&Itemid=3855&lang=pt>. Acesso em: 30 março 2014.

WOJEWÓDZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, p. 9-20, 2002.

WOO, C.C. *et al.* Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR-g pathway. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 464–475, 2011.

YARROW, J.C. *et al.* A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnology**, v. 4, p. 1-9, 2004.

YIN, J. *et al.* The effect of Z-Ligustilide on the mobility of human glioblastoma T98G cells. **Plos One**, v. 8, p. 1-7, 2013.

YOUNES, R.N. *et al.* Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, p. 763-768, 2007.

ZAKI, M.A. *et al.* Cytotoxicity and modulation of cancer-related signaling by (Z)- and (E)-3,4,3',5'-Tetramethoxystilbene isolated from *Eugenia rigida*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 679–684, 2013.

ZHANG, A. *et al.* Metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of colorectal cancer. **Cancer Letters**, v. 345, p. 17–20, 2014.