

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**LUCAS TREVISAN FRANÇA DE LIMA**

**EFEITOS ANTITUMORAIS DE ÓLEOS ESSENCIAIS NANOPARTICULADOS  
DE *Mentha villosa* E *Curcuma longa***



**CURITIBA**

2017

**LUCAS TREVISAN FRANÇA DE LIMA**

**EFEITOS ANTITUMORAIS DE ÓLEOS ESSENCIAIS NANOPARTICULADOS  
DE *Mentha villosa* E *Curcuma longa***

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri

Co-orientadora: Msc. Andressa Chequin

Departamento de Patologia Básica

**CURITIBA**

**2017**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Edneia A. S. R. Cavalieri, pelo apoio, pelos ensinamentos e, principalmente, por ser uma das primeiras pessoas responsáveis por despertar em mim o interesse pela biologia molecular logo no início da graduação.

À Prof<sup>a</sup>. Giseli Klassen, pelos ensinamentos e ajuda no laboratório.

À minha coorientadora, Andressa Chequin, pela ajuda (e não foi pouca!), e às demais colegas de laboratório Angie e Fernanda, pela convivência e por tornar meus dias no laboratório mais divertidos.

À doutoranda da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (UFPR) e veterinária do IFC Araquari Amanda Chaaban pela obtenção dos óleos essenciais e por ceder as amostras para este trabalho. Ao Dr Fabiano Cleber Bertoldi EPAGRI-SC pela produção das nanoemulsões. Gostaria de também agradecer ao Prof. Dr. Marcelo B. Molento por ceder os compostos isolados, bem como financiar parte deste projeto.

Aos amigos que a biologia me proporcionou, Luana, Rafael, Mc, Fernanda e Mariana, que tornaram estes últimos anos mais fáceis.

Aos meus amigos Guilherme Lohn e Matheus Augusto, com quem compartilhei, provavelmente, os melhores e também os mais difíceis momentos da minha vida e que sempre estiveram lá, seja para dar risada ou para chorar as mágoas.

À Carolina Cafisso, pelo companheirismo, pelo carinho e pela paciência (e muita!).

E, finalmente, aos meus pais, que em meio às risadas, às brincadeiras e até mesmo às tretas (que fazem parte!) me tornaram quem eu sou hoje.

Agradeço a todos!

## RESUMO

O câncer abrange um conjunto de mais de 100 doenças e é o responsável por 13% das mortes no mundo e 15% no Brasil. Isto demonstra uma carência de agentes antitumorais que promovam a cura ou aumento na expectativa de vida dos pacientes. Neste contexto, a utilização de fontes naturais se mostra promissora na identificação de novas moléculas que podem ser usadas como adjuvantes no tratamento do câncer. Estudos anteriores demonstraram que os óleos essenciais de *Curcuma longa* e de *Mentha villosa* apresentam ação antiproliferativa em células tumorais. Este trabalho tem o objetivo de avaliar a atividade antitumoral destes óleos na forma de nanoemulsão sobre células tumorais de mama (MDA-MB-231) e também de seus compostos majoritários isolados,  *$\alpha$ -phellandrene* e R-carvone. Para isto, foram realizados ensaios de viabilidade celular comparando o efeito das moléculas sobre células normais e tumorais de mama. Os resultados mostram que tanto os óleos essenciais, quanto os compostos isolados provocam uma diminuição significativa na viabilidade celular, e esta diminuição é maior em células tumorais quando comparadas a normais. Foi observado também que o tratamento com os óleos essenciais provoca uma diminuição na migração celular, fazendo com que a célula passe de um fenótipo mesenquimal para um epitelial, tornando-a menos invasiva. Através da técnica de RT-qPCR, foram avaliados genes envolvidos nesta transição epitélio-mesênquima. Foram observadas alterações significativas na expressão tanto de genes epiteliais, como mesenquimais. Os genes mesenquimais com expressão aumentada foram *VIM* e *MMP2*. Ensaios de atividade e imunodeteção demonstraram uma diminuição da proteína MMP-2, associada a metástase, corroborando para um fenótipo menos invasivo. A análise de expressão também mostrou um aumento de mais de 7000 vezes na expressão de E-caderina, uma molécula de adesão célula-célula associada a melhores prognósticos no câncer de mama. A partir destes resultados, foi possível atribuir o fenótipo epitelial observado ao aumento de E-caderina associado à diminuição de MMP-2. Estes dados preliminares apontam o R-carvone e  *$\alpha$ -phellandrene* como potenciais agentes no tratamento de câncer de mama e são necessários novos estudos para compreender seus mecanismos de atuação.

## ABSTRACT

Cancer includes a group of more than 100 diseases and it is responsible for 13% of deaths worldwide and 15% in Brazil. These data show the deficiency of more effective anticancer agents that lead to a cure or increased life expectancy of the patients. In this context, the use of natural sources is promising for identification of new molecules that may be used as adjuvants in cancer treatment. Previous studies show that essential oils from *Curcuma longa* and *Mentha villosa* present antiproliferative activities against tumor cell lines. The aim of this study is to evaluate antitumor activities of these essential oils in the form of nanoemulsion against breast tumor cells (MDA-MB-231) and also the major compounds isolated from them,  $\alpha$ -phellandrene and R-carvone. For this, cellular viability assay was used to compare the effect of these molecules on normal and tumor cells. The results show that both the essential oils and the isolated compounds cause significant decrease in cell viability, and this decrease is greater in tumor cells. It was also observed that treatments with the essential oils inhibit cellular migration, inducing the cell to transition from a mesenchymal to epithelial phenotype, making it less invasive. Using RT-qPCR, genes involved in this epithelial-mesenchymal transition were analyzed. Results show significant increase in expression of both epithelial and mesenchymal genes. Mesenchymal genes that showed increased expression levels were *VIM* and *MMP-2*. Protein activity and western blot assay showed a decrease in *MMP-2*, a protein associated with metastasis, corroborating to a less invasive phenotype. Gene expression analysis also showed an increase of more than 7000 times in the expression of E-cadherin, a cell-cell adhesion molecule associated with better prognosis in breast cancer. This preliminary data indicates R-carvone and  $\alpha$ -phellandrene as potential agents in breast cancer treatment and further studies are necessary for a better understanding regarding its mechanism of action.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA <i>M. villosa</i> .....	19
FIGURA 2 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA <i>C. longa</i> .....	19
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO R-(-)-CARVONE.....	23
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO $\alpha$ -PHELLANDRENE.....	24
FIGURA 5 – ENSAIO DE VIABILIDADE COM OS ÓLEOS ESSENCIAIS.	35
FIGURA 6 – ENSAIO DE VIABILIDADE COM OS COMPOSTOS ..... ISOLADOS EM BAIXA CONCENTRAÇÃO	36
FIGURA 7 – ENSAIO DE VIABILIDADE COM OS COMPOSTOS ..... ISOLADOS EM ALTA CONCENTRAÇÃO	37
FIGURA 8 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DA LINHAGEM MDA-MB-231..	39
FIGURA 9 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	40
FIGURA 10 – GRÁFICO DAS TAXAS DE MIGRAÇÃO.....	42
FIGURA 11 – RT-PCR DO GENE GAPDH.....	43
FIGURA 12 – EXPRESSÃO GÊNICA NA LINHAGEM MDA-MB-231.....	44
FIGURA 13 – ZIMOGRAFIA E EXPRESSÃO DE MMMP-2.....	45
FIGURA 14 – WESTERN BLOT.....	46

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	27
TABELA 2 – SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS.....	31
TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA (IC <sub>50</sub> ).....	37

## LISTA DE SIGLAS

ADAM33 – do inglês, *A Disintegrin and Metaloproteinase 33*

BSA – Albumina Sérica Bovina

cDNA – DNA complementar

CpG – Nucleotídeo C seguido de G

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfatase desidrogenase

HPRT – Hipoxantina Fosforribosil transferase

IC<sub>50</sub> – Concentração Inibitória Média

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MAPK – do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinases*

MMP – Metaloprotease de Matriz

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]

NO – Óxido Nítrico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-PCR – Técnica de PCR com Transcriptase reversa

RT-qPCR – Técnica de PCR em tempo real com Transcriptase reversa

RPMI – Meio de cultura celular Roswell Park Memorial Institute

SATR-1 – Proteína regulatória Esteroidogenica Aguda 1

SFB – Soro Fetal Bovino

TIMP-2 – Inibidor tecidual de metaloproteases 2

## SUMÁRIO

RESUMO.....	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 O CÂNCER.....	11
2.2 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER.....	12
2.2.1 Marcadores moleculares de câncer .....	12
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	15
2.3.1 Atribuições biológicas dos extratos de <i>Mentha villosa</i> e de <i>Curcuma longa</i> .17	
2.3.2 (R)-(-)-Carvone e $\alpha$ - <i>Phellandrene</i> .....	20
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1 Material Biológico .....	24
4.2 Obtenção dos óleos essenciais e produção das nanoemulsões .....	24
4.3 Tratamento dos cultivos .....	26
4.4 Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT.....	27
4.5 Ensaio de Migração Celular.....	27
4.6 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	28
4.6.1 Análise da Expressão Gênica por RT-qPCR .....	28
4.7 Análise da atividade de metaloprotease de MMP-2 por zimografia.....	30
4.8 Imunodeteção de proteínas ou <i>western blotting</i> .....	30
5 RESULTADOS .....	32
5.1 Ensaio de viabilidade celular .....	32
5.2 Ensaio de migração.....	36
5.3 Análise da expressão gênica.....	40
5.4 Ensaio de atividade de MMP-2 por zimografia .....	42
6 DISCUSSÃO .....	44
7 CONCLUSÕES .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento, superado apenas por doenças cardiovasculares. O aumento da incidência do câncer nos últimos anos está relacionado ao crescimento populacional e aumento da vida média, assim como às mudanças no estilo de vida que aumentam as chances da doença, como sedentarismo, tabagismo, hábitos alimentares inadequados e exposição a riscos ambientais (JEMAL *et al.*, 2011).

O câncer abrange um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas por um crescimento desordenado de células com a capacidade de invadir tecidos e órgãos (MENDONÇA *et al.*, 2004). No Brasil, estima-se o aparecimento de mais de 300 mil novos casos de câncer para o biênio 2016-2017, sendo o câncer de próstata o mais comum entre os homens (28,6%) e o câncer de mama o mais comum entre as mulheres (28,1%) (INCA, 2017). O aumento da incidência da doença é devido a maior exposição a fatores de risco. Contudo, os avanços no diagnóstico precoce e no tratamento impedem o aumento da taxa de mortalidade (JEMAL *et al.*, 2011).

O tratamento do câncer através de quimioterapia e de medicamentos é frequentemente comprometido pelos efeitos colaterais adversos e pelo desenvolvimento de resistência aos fármacos (ZU *et al.*, 2010). Nesses casos uma medida comum é o aumento da dosagem da medicação, acompanhado pelo aumento dos efeitos citotóxicos do tratamento. Por isso, são necessários estudos que busquem novos métodos de tratamento e formas de inibir ou controlar os mecanismos de resistência de tumores (OLIVEIRA, 2015). Neste contexto, destaca-se a importância do estudo de compostos de fontes vegetais para utilização como adjuvantes no tratamento de câncer. Entre estes compostos, os óleos essenciais tem recebido maior atenção devido a suas propriedades terapêuticas e farmacológicas (EDRIS, 2007).

Os óleos essenciais são compostos naturais voláteis e complexos caracterizados por um forte odor, produzidos como metabólitos secundários em plantas aromáticas (BAKKALI *et al.*, 2008). Estes óleos apresentam diferentes propriedades biológicas, como inseticida (RAJKUMAR *et al.*, 2010),

antioxidante (WANNES *et al.*, 2010), analgésica, anti-inflamatória (MENDES *et al.*, 2010) e antitumoral (SILVA, 2008). Estes compostos são utilizados pela medicina tradicional desde os tempos antigos para desordens de saúde comuns, como cólicas menstruais, febre, colesterol alto ou ainda para auxiliar na cicatrização de ferimentos (OLIVEIRA, 2015).

Os dois óleos escolhidos para este estudo foram os óleos essenciais de cúrcuma (*Curcuma longa*) e hortelã-miúda (*Mentha villosa*) para a avaliação da atividade antitumoral. O óleo de hortelã é tradicionalmente utilizado devido a suas propriedades antinociceptivas e indução de efeitos hipotensivos devido a vasodilatação (OLIVEIRA, 2015). Entretanto, estudos recentes mostram que este composto também possui atividade citotóxica e antitumoral para linhagens de células de adenocarcinoma ovariano, carcinoma de cólon e glioblastoma (AMARAL *et al.*, 2015). O óleo de cúrcuma destaca-se por suas propriedades gastroprotetoras, anti-inflamatórias, hipoglicemiantes, antimicrobianas e antioxidantes (MARCHI, 2016). Entretanto, a atividade antitumoral do óleo proveniente de folhas de *Curcuma longa* ainda é pouco conhecida.

Os principais componentes de óleos essenciais são terpenos e compostos aromáticos. Essa composição pode variar de acordo com os fatores ambientais a que a planta é submetida e a parte da planta utilizada para a extração dos óleos. Geralmente atribui-se as atividades biológicas de um determinado óleo às moléculas disponíveis em maior concentração (LAKEHAL *et al.*, 2016). O óleo de folhas de hortelã-miúda apresenta diversos compostos relacionados à via de biossíntese de limoneno, entre eles o cis-carveol, acetato de dihidrocarveol e L-carvone, além do óxido de piperitenona, composto usado em larga escala na indústria. Entretanto, o composto majoritário encontrado neste trabalho foi o R-carvone, descrito por outros autores como minoritário nesta espécie (SOUZA *et al.*, 2009).

A cúrcuma tem como principal produto a curcumina, composto isolado da raiz. A curcumina e outros curcuminóides são bem estudados devido a suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e são utilizados na prevenção do câncer (MANOLOVA *et al.*, 2014). O óleo proveniente de folhas de cúrcuma, entretanto, tem seus componentes menos conhecidos, uma vez que a principal parte da planta utilizada é a raiz. O composto majoritário nas folhas é o  $\alpha$ -*phellandrene* (BEHURA *et al.*, 2002; TRIPATHI *et al.*, 2002; PARVEEN *et al.*,

2013). Tanto o R-carvone, quanto o  $\alpha$ -phellandrene apresentam efeitos citotóxicos frente a linhagens celulares tumorais, entretanto os mecanismos de morte celular e alterações na expressão gênica ainda permanecem pouco estudados. Estudos sugerem que o  $\alpha$ -phellandrene está relacionado à indução de necrose e autofagia, enquanto o R-carvone está relacionado a apoptose (HSIEH *et al*, 2015; CARVALHO e FONSECA, 2017).

Tendo em vista o potencial terapêutico dos óleos essenciais destas plantas e a carência de fármacos com atividades antitumorais ou metastáticas, é importante avaliar a ação dessas espécies frente a linhagens de células tumorais e identificar alterações epigenéticas que podem estar envolvidas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O CÂNCER

O câncer abrange um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células e é uma das doenças que mais acometem pessoas no mundo. Estas células possuem alta capacidade invasiva, podendo chegar a outros órgãos e tecidos. Por isso, a detecção da doença em estado avançado em muitos casos leva ao óbito (JEMAL *et al.*, 2011).

Segundo a *American Cancer Society*, estima-se o aparecimento de 1,7 milhões de novos casos de câncer em 2017, com mais de 500 mil mortes estimadas apenas nos Estados Unidos. Entretanto, a taxa de morte causada pela doença vem diminuindo durante as últimas décadas, hoje representando 25% e resultando numa redução de 2,1 milhões de mortes (SIEGEL *et al.*, 2017). Para o Brasil, estatísticas do INCA (Instituto Nacional do Câncer) apontam o aparecimento de 600 mil novos casos de câncer para o biênio 2016-2017. Em homens, os tipos mais frequentes de câncer são próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%), respectivamente. Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figuraram entre os principais (INCA, 2016).

Mudanças nos hábitos de vida e nas dinâmicas populacionais são apontadas como fatores de risco que levam ao desenvolvimento do câncer. Entre estes hábitos pode-se destacar o tabagismo, sedentarismo e a alimentação. Quanto aos padrões demográficos, estudos mostram que o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento da população são um fator de risco, uma vez que muitos tipos de câncer são mais comuns após a faixa dos 35 anos (JERÔNIMO *et al.*, 2017).

## 2.2 MECANISMOS MOLECULARES DO CÂNCER

Estudos de Hanahan e Weinberg compilaram as alterações moleculares envolvidas com o desenvolvimento do câncer. Estas alterações foram relacionadas com a progressão tumoral, sendo eles a manutenção dos sinais de proliferação; o escape da ação de supressores de tumor; resistência aos sinais indutores de morte celular; indução de imortalidade replicativa e de angiogênese; inflamação pró-tumoral; alterações no metabolismo energético; evasão do sistema imune; instabilidade genômica e mutações; ativação de invasão e metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A maioria das alterações moleculares tem como ponto inicial danos no genoma ou epigenoma que são acumulados ao longo da vida e geram um desbalanço entre a atividade proliferativa e apoptótica das células. Estes danos podem ser causados por fatores internos, como desequilíbrio hormonal, ou por fatores externos, como exposição à radiação ou produtos químicos tóxicos (ZENG *et al.*, 2005). Além disso, o microambiente tumoral tem um papel crítico como regulador na progressão tumoral por seu contato direto com as células tumorais, atuando como uma fonte importante de fatores de crescimento, de mobilidade, angiogênicos, entre outros, que afetam significativamente a biologia tumoral, como as metástases e a resistência às terapias (BISSELL *et al.*, 2002).

O processo de metástase é definido como o espalhamento de células do tumor para outros locais do corpo, onde formam tumores secundários. Isto ocorre porque, em algum momento durante o desenvolvimento do tumor, são formadas células que adquirem a capacidade de invadir novos tecidos, degradar a matriz extracelular e chegar até a corrente sanguínea ou linfática. Para esta fase o direcionamento é realizado pelas quimiocinas produzidas tanto pelas células tumorais, quanto pelo tecido a ser colonizado (MULLER *et al.*, 2001; ARTACHO-CORDÓN, 2012; HANAHAN e WEINBERG, 2011)

### 2.2.1 Marcadores moleculares de câncer

O potencial metastático de uma célula tumoral depende de um conjunto de características que a permite deixar o local do tumor primário e estabelecer

novos focos tumorais. Esse processo, denominado transição epitélio-mesênquima, inclui a perda da aderência célula-célula, o aumento da motilidade e invasividade celular e a capacidade de colonizar novos tecidos. O resultado é a transformação de uma célula com características epiteliais para uma mesenquimal, associada a piores prognósticos (ONDER *et al.*, 2008).

A E-caderina, codificada pelo gene supressor tumoral *CDH1*, é uma glicoproteína transmembrana cálcio-dependente que está presente nas junções aderentes, fazendo a adesão célula-célula. No seu domínio citoplasmático, está ligada à actina do citoesqueleto através das proteínas cateninas intracelulares ( $\alpha$ ,  $\beta$  e p120) (HAJRA *et al.*, 2002). A diminuição da expressão de E-caderina em células tumorais está associada à metástase e à maior capacidade invasiva (KALLURI e WEINBERG, 2009).

A Vimentina é uma proteína estrutural dos filamentos intermediários do citoesqueleto. A alta expressão desta proteína está associada a células com características mesenquimais e geralmente associada a baixos níveis de expressão de E-caderina (KOKKINOS *et al.*, 2007; SATELLI e LI, 2011). Na célula, a vimentina tem a função de manter a arquitetura do citoesqueleto e organizar a polaridade dos microtúbulos, possibilitando maior motilidade celular. Portanto, altos níveis de expressão levam a tumores de maior malignidade e capacidade de metástase (LIU *et al.*, 2015).

Outro processo essencial para que ocorra a metástase é a degradação da matriz extracelular, permitindo que as células tumorais invadam os tecidos adjacentes e cheguem aos vasos sanguíneos (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Esse processo é mediado por proteases, dentre as quais destacam-se as metaloproteases de matriz (MMPs) que são proteínas zinco-dependentes capazes de clivar diversos substratos presentes na matriz extracelular, como colágeno, gelatina, elastinas e outras glicoproteínas. Estudos demonstram que, em diversos tipos de câncer, esta atividade encontra-se desregulada, favorecendo o início da carcinogênese e a invasão tumoral (POINCLOUX *et al.*, 2013). Dentro deste grupo, destaca-se a MMP-14, que é expressa na superfície de múltiplos tipos celulares e mostra-se importante na locomoção celular e degradação da matriz extracelular a partir de sua capacidade proteolítica e também a partir da ativação de outras MMPs solúveis, tais como a MMP-2, MMP-8 e MMP-13. Muitos componentes da matriz extracelular podem ser

substrato da proteína MMP-14, como: colágeno I, II e III, fibronectina, vitronectina, fibrina e proteoglicanos (PAHWA *et al.*, 2014).

A atividade das MMPs nos tecidos é regulada por um inibidor tecidual de metaloproteases 2 (TIMP-2). Este processo envolve, principalmente, as proteínas MMP-2, TIMP-2 e MMP-14 (HU *et al.*, 2007). O TIMP-2, quando em altas concentrações, é capaz de ligar-se ao sítio catalítico das MMPs, inibindo sua atividade. Entretanto, quando se liga simultaneamente a uma MMP-14 presente na membrana plasmática e uma pró-MMP-2, ele provoca a clivagem desta proteína, formando MMP-2 ativa. Portanto, o TIMP-2 funciona tanto como um inibidor, quanto ativador e o entendimento do equilíbrio entre essas funções na célula auxilia na compreensão dos mecanismos que levam a metástase (BERNARDO e FRIDMAN, 2003).

As proteínas da família ADAM (*A Disintegrin and Metaloproteinase*) são moléculas complexas formadas por diversos domínios: pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio disintegrina, região rica em cisteínas, domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like*), domínio transmembrana e cauda citoplasmática (MOCHIZUKI E OKADA, 2007). Elas desempenham um papel biológico importante na clivagem e ativação de proteínas da superfície celular, adesão célula-célula e proteólise de componentes da matriz extracelular. Por desempenhar este papel proteolítico, a maioria das proteínas ADAM é relacionada a características mesenquimais e associadas a piores prognósticos (REISS E SAFTIG, 2009).

A proteína ADAM33, entretanto, parece estar mais envolvida com a adesão celular e inibição da migração através da interação com integrinas, proteínas de adesão presentes na membrana (HUANG *et al.*, 2005). Estudos recentes demonstraram que esta proteína é expressa diferencialmente entre diversas linhagens de tumor de mama (SENISKI *et al.*, 2009). Ainda, foi possível correlacionar altos níveis de expressão dessa proteína a melhores prognósticos, indicando que a ADAM33 pode ser um bom biomarcador para o estudo do câncer (MANICA *et al.*, 2017).

### 2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são compostos naturais voláteis e complexos obtidos a partir de plantas aromáticas. Estes compostos são produtos do metabolismo secundário da planta e são extraídos por meio de processos de destilação (OLIVEIRA, 2015). Qualquer parte da planta pode produzir os óleos essenciais, e ainda cada parte pode produzir de modo diferente. Esses óleos são armazenados em glândulas, canais vasculares, células epidérmicas ou associados a tricomas, por onde são liberados (EDRIS, 2007). Devido a suas propriedades biológicas, são utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e na medicina tradicional (BAKKALI *et al.*, 2008).

Na natureza, os óleos essenciais são importantes para a sobrevivência da planta, pois possuem atividades antimicrobianas e inseticidas que a conferem proteção contra herbivoria (BAKKALI *et al.*, 2008). Para utilização na indústria farmacêutica, outras atividades biológicas de óleos essenciais atraem a atenção, como antiparasitária, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, espasmolítica, hipotensiva, anticonvulsivante, antioxidante e antitumoral (SANTOS *et al.*, 2011).

A composição química dos óleos varia de acordo com a espécie e as condições de cultivo, como o clima e as características do solo (MANOSROI *et al.*, 2005). Eles são caracterizados por dois ou três componentes majoritários em maior concentração (30-70%), mas podem conter mais de 50 moléculas diferentes. Estas moléculas podem ser terpenos, moléculas de álcool ou fenol compostas por cinco carbonos, ou compostos aromáticos, que apresentam anéis benzênicos em sua composição (BAKKALI *et al.*, 2008).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é tão antigo quanto a espécie humana e, atualmente, sabe-se que muitos dos efeitos observados devem-se aos óleos essenciais (GAUTAM *et al.*, 2014). Neste contexto, a etnobotânica tem grande importância, uma vez que vários extratos de plantas utilizados por populações tradicionais para o tratamento de diversas doenças, quando submetidos a teste iniciais de toxicidade e avaliação do efeito sobre o ciclo celular em células tumorais, revelam potencial anticâncer (HEINRICH e BREMNER, 2006). Os óleos essenciais atraem considerável interesse devido a diversidade de seus constituintes bioativos, os quais

desempenham um papel importante na prevenção e tratamento do câncer (CRAGG e NEWMAN, 2015).

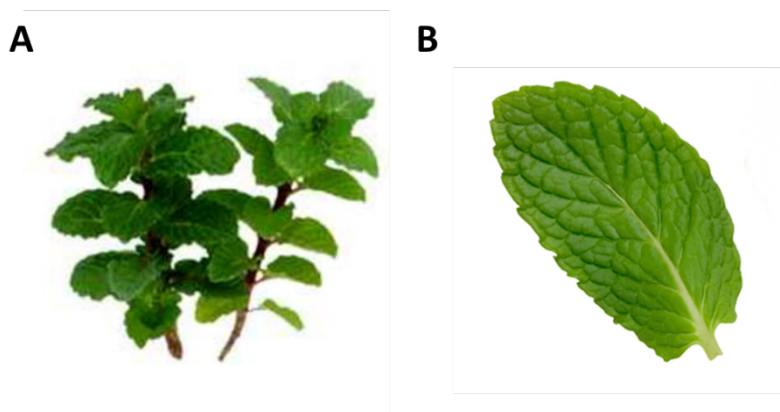
Muitos dos tratamentos atuais para o câncer são derivados de plantas medicinais, como os compostos derivados de vinca (*Catharanthus roseus* Don), vincristina e vinblastina, amplamente utilizados em tratamentos quimioterápicos. Essas moléculas interagem com a tubulina e alteram a estrutura do citoesqueleto, inibindo a formação do fuso mitótico e provocando parada do ciclo celular na metáfase (MOUDI *et al.*, 2013). A atividade quimiopreventiva está relacionada principalmente à suas possíveis propriedades antimutagênicas, impedindo a entrada ou inibindo a ação de agentes mutagênicos nas células, capturando radicais livres e ativando enzimas antioxidantes (BAKKALI *et al.*, 2008). Já a ação antitumoral da vinca está relacionada principalmente à indução da apoptose e inibição da angiogênese tumoral, inibindo a proliferação celular (EDRIS, 2007).

O paclitaxel, um dos principais medicamentos utilizados no tratamento do câncer, foi isolado da casca de teixo (*Taxus brevifolia*), árvore nativa da América do Norte. O paclitaxel também é classificado como uma droga que afeta o citoesqueleto, interagindo diretamente com a proteína tubulina presente nos microtúbulos. Entretanto, ele não provoca a degradação do citoesqueleto, mas sim uma hiperpolarização, que o torna inflexível e impede a formação do fuso mitótico na divisão celular (PELTIER *et al.*, 2006). A morte celular induzida pela droga ocorre por apoptose, pelas vias caspase-dependente e independente. O paclitaxel regula a expressão dos genes *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bad* e *Bim*, envolvidos na ativação das proteínas caspases, e modula a transdução de sinal, principalmente pela via MAPK (AMIN *et al.*, 2009).

Contudo, ainda existem muitos óleos com moléculas desconhecidas que podem possuir atividade anticâncer e o estudo dessas moléculas e a compreensão do seu mecanismo de ação demonstra um cenário promissor para o desenvolvimento de protocolos de tratamentos mais eficazes contribuindo como adjuvantes a tratamentos de pacientes neoplásicos (BHALLA *et al.*, 2013; BRAHMI *et al.*, 2017).

### 2.3.1 Atribuições biológicas dos extratos de *Mentha villosa* e de *Curcuma longa*

A *Mentha villosa* (Figura 1), popularmente conhecida hortelã-miúda ou menta, é uma planta herbácea perene de pequeno porte, cuja inflorescência e folhas são ricas em óleos essenciais. Nestes óleos estão presentes moléculas de grande interesse comercial, como o mentol e a mentona, utilizados como antisséptico, anestésico, aromatizantes e na indústria alimentícia, e o carvone, importante agente antimicrobiano e antisséptico, entre outros compostos (BAKKALI *et al.*, 2005).



**Figura 1 – Aspectos morfológicos da *Mentha villosa*.** À esquerda (A) é mostrado o aspecto herbáceo da planta, cuja parte vegetativa é formada principalmente pelas folhas. À direita (B), detalhe da folha.

**FONTE:** Adaptado de Forzza *et al.*, 2010.

A *Mentha villosa* é empregada na medicina popular, principalmente na região Nordeste, para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, inflamações na garganta, febre, queimaduras de sol e irritações na pele. Os extratos obtidos desta planta, entretanto, são conhecidos principalmente por sua atividade antimicrobiana e anti-helmíntica. Estudos demonstram que esses extratos são capazes de inibir a proliferação de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella tiphymurium*, *Enterobacter aeroginum* e *Pseudomonas aeruginosa* (ISCAM *et al.*, 2006).

Algumas atividades desta espécie foram comprovadas como amebicidas (*Entamoeba histolytica*) e giardicida (*Giardia lamblia*). Essas propriedades atraem o interesse de indústrias farmacêuticas, já existindo no mercado um medicamento produzido à base de folhas de *Mentha villosa*, chamado de Giamebil Plus® e utilizado no tratamento de infecções intestinais por estes organismos. (TELES *et al.*, 2011). Ainda, é utilizada popularmente no

tratamento de infecções por *Trichomonas vaginalis*, cuja eficácia foi comprovada por estudos de Moraes e colaboradores (2012). Estes estudos demonstraram que o extrato apresentou efeitos equivalentes a outra droga já utilizada no tratamento da doença.

Os extratos obtidos das folhas de *Mentha villosa* apresentam ainda outras propriedades farmacológicas e biológicas como relaxante do músculo liso intestinal (SOUSA *et al.*, 2009), hipotensora, vasodilatadora, espasmolítica (LAHLOU *et al.*, 2002) e antitumoral. Na linhagem tumoral de adenocarcinoma de pulmão (A549), tratamentos com óleo essencial de *Mentha villosa* provocaram diminuição significativa da viabilidade celular, fragmentação do DNA evidenciada por ensaio cometa e arraste do ciclo celular na fase S (OLIVEIRA, 2015).

Amaral *et al* (2015) testaram este extrato frente a linhagens tumorais de glioblastoma (SF-295), adenocarcinoma de ovário (OVCAR-8) e carcinoma de cólon (HCT-116), e observaram diminuição da viabilidade celular. Neste mesmo trabalho, testes *in vivo* utilizando a linhagem Sarcoma 180 em camundongos e demonstraram diminuição no tamanho do tumor nos camundongos tratados com o extrato de *M. villosa*, com baixa toxicidade sistêmica (AMARAL *et al.*, 2015). Esses efeitos sobre a viabilidade celular também foram observados para as linhagens Hela (carcinoma de cérvix) e Vero (células hepáticas de macaco verde africano) (RAHIMIFARD *et al.*, 2010).

Jain *et al* (2011) realizaram estudos utilizando extratos de folhas de *M. villosa* frente a linhagens tumorais de mama (MCF7), adenocarcinoma de cólon (HT-29), carcinoma de bexiga (T24), adenocarcinoma cervical (Hela) e duas linhagens normais, de fígado (HEK-293) e fibroblasto pulmonar (IMR-90). Foi observado um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e indução da apoptose através do aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax. Ainda, ocorreu a parada do ciclo celular em G1 devido ao aumento da expressão das proteínas reguladoras p53 e p21, medidas através de imunodeteção (JAIN *et al.*, 2011).

A cúrcuma (*Curcuma longa*) é uma planta utilizada tradicionalmente na culinária (conhecida como açafrão-da-terra) e como planta medicinal (Figura 2). Na medicina tradicional, é usualmente utilizada no tratamento de doenças da pele, distúrbios estomacais, doenças do fígado e em resfriados com

comprometimento das vias nasais. Os pigmentos curcuminóides, incluindo a curcumina, são as moléculas mais abundantes nesta planta e o composto majoritário dos óleos essenciais (CHEN *et al.*, 1998). Esta molécula é extraída principalmente do rizoma da planta e já demonstrou atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e quimiopreventiva (MAHESHWARI *et al.*, 2006).



**Figura 2 – Aspectos morfológicos da *Curcuma longa*.** A parte aérea é formada pelas folhas e pseudocaule, e o rizoma é tuberizado e ramificado.

**Fonte:** Forzza *et al.*, 2010.

Os óleos essenciais obtidos das folhas de *C. longa*, entretanto, apresentam uma composição diferente, tendo como compostos majoritários o *phellandrene* e pinene, como demonstrado por Behura *et al* (2002) e Mata *et al* (2004). Esses óleos, apesar de menos estudados do que os provenientes do rizoma, já se mostraram eficientes no tratamento de doenças do sistema urogenital e hepáticas e possuem atividades antimicrobianas, inseticidas e antitumorais.

Chookote *et al* (2006) mostraram que os óleos essenciais provenientes da hidrodestilação das folhas de cúrcuma possuem um efeito inseticida equivalente a outros inseticidas comerciais quando testados em *Aedes aegypti*. O mesmo efeito foi observado para *Tribolium castaneum* e outras espécies de besouros consideradas pragas agrícolas de soja e alface (ALI *et al.*, 2014). A atividade antimicrobiana foi estudada por Parveen *et al* (2013), que testou o potencial de inibição dos óleos frente a cinco espécies de fungo do gênero *Aspergillus* e diversas espécies bacterianas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphyrum*, *Bacillus subtilis* e *Enterobacter*

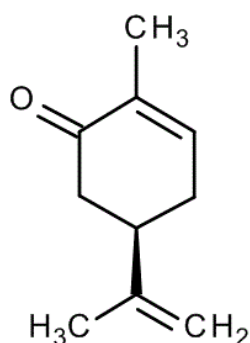
*aerogenes*, algumas delas patogênicas. Ele observou potencial de inibição para todos os microrganismos testados (PARVEEN *et al.*, 2013).

Os principais estudos do efeito antitumoral da *Curcuma longa* estão relacionados aos curcuminóides. Manosroi *et al* (2006) observaram que óleos de *C. longa* inibem a proliferação celular em células tumorais de carcinoma de boca (KB) e leucemia murina (P388). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos não foram estudados (MANOSROI *et al.*, 2006). Esta atividade também foi testada para a linhagem tumoral de cérvix (Hela), onde foi possível observar alterações morfológicas, diminuição da viabilidade celular e aumento da produção de EROS em resposta aos tratamentos (ARAUJO, 2015).

Estudos realizados por Chen e Huang (1998) demonstraram que os óleos essenciais da cúrcuma provocam a parada do ciclo celular e induzem apoptose em células de músculo liso vascular (A7r5) utilizadas no estudo da aterosclerose em ratos. Este estudo observou ainda um aumento na fragmentação do DNA das células e diferenças na expressão dos genes *TP53*, *bcl-2* e *c-myc*, que estão relacionados ao controle da proliferação celular e da apoptose. Esta diferença também foi observada a nível de proteína através de imunodeteccção. Os mecanismos de morte também foram estudados por Jana *et al* (2004) e Hallman *et al* (2017), onde ambos observaram que a cúrcuma induz alterações na expressão de genes relacionados a apoptose pela via mitocondrial, como *TP53*, *Bcl-2*, *Bcl-XL* e *Bax*.

### 2.3.2 (R)-(-)-Carvone e $\alpha$ -Phellandrene

O composto carvone (*p*-menta-2,8-dien-2-one) é uma das principais moléculas bioativas isoladas das espécies de *Mentha*, sendo classificado como um monoterpene monocíclico, hidrocarboneto com fórmula química  $C_{10}H_{16}$  (Figura 3).

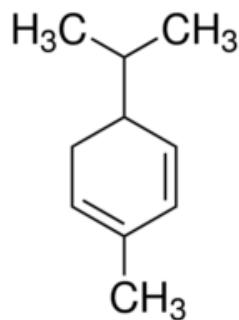


**Figura 3 – Estrutura química da molécula de R-(-)-carvone.**

Diferentes enantiômeros de carvone apresentam atividade antifúngica, antimicrobiana, inseticida e anestésica, agindo sobre o sistema nervoso periférico e central (PATTEL E THAKKAR, 2014). Quanto à atividade antitumoral, Patel e Thakkar (2014) demonstraram que tratamentos com L-carvone foram capazes de inibir a migração celular, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio e induzir a apoptose de linhagens tumorais de câncer de mama. Neste estudo, foi encontrado um  $IC_{50}$  igual a 1 mM, o que significa que o tratamento com 1 mM foi suficiente para reduzir em 50% a viabilidade celular. Neste mesmo estudo, foi possível demonstrar que o carvone induz a formação de EROS, a fragmentação do DNA e a perda da estrutura do núcleo. A presença de apoptossomos e o aumento na expressão das proteínas p53, Bad e caspase-3 ativa indicam que o carvone induz a apoptose (PATTEL e THAKKAR, 2014).

Esta mesma atividade citotóxica também foi observada por Aydin *et al* (2015) em linhagens de neuroblastoma, sugerindo o L-carvone como um promissor agente para o tratamento de neuroblastoma (AYDIN *et al.*, 2015). Entretanto, estes mesmos efeitos não foram observados em células de melanoma B16F-10, sem efeito sobre o ciclo celular e apoptose, indicando que esta molécula pode ter diferentes mecanismos de ação para cada linhagem tumoral (RAFHAEL E KUTTAN, 2006).

O  $\alpha$ -*phellandrene* (5-isopropyl-2-methyl-1,3-cyclohexadiene) é um monoterpene encontrado em plantas utilizadas como ervas e temperos (Figura 4).



**Figura 4 – Estrutura química da molécula de  $\alpha$ -phellandrene.**

As atividades biológicas do  $\alpha$ -phellandrene permanecem pouco estudadas, mas sugere-se que ele possui atividade antimicrobiana, inseticida e antitumorais. Este composto é capaz de inibir a proliferação de fungos, com destaque para os gêneros *Penicillium* e *Candida* (ZHANG *et al.*, 2017). Ele também inibe a proliferação de besouros e dípteros relacionados a plantações de milho (ZAGALLI *et al.*, 2017). Enquanto a atividade antibiótica já foi demonstrada para diversas espécies, a atividade antitumoral permanece pouco compreendida.

Hsieh e colaboradores (2014) demonstraram em diversos trabalhos que o  $\alpha$ -phellandrene induz a necrose de maneira dose-dependente na linhagem tumoral hepática J5. Neste estudo, foi observada uma diminuição na viabilidade de células tratadas por 24h sem alteração em genes clássicos relacionados a apoptose, como *Bax*, *Bcl-2* e que acionam as caspases. Observou-se, no entanto, aumento significativo na produção de óxido nítrico (NO) e depleção de ATP, o que, associado a danos na membrana celular, provoca o estado necrótico (HSIEH *et al.*, 2014). Entretanto, outros estudos realizados pelo mesmo grupo demonstraram aumento na expressão de genes pró-apoptóticos e diminuição de sinais antiapoptóticos, sugerindo que ambos os mecanismos de morte celular podem ser desencadeados pelo  $\alpha$ -Phellandrene (HSIEH *et al.*, 2015).

Ensaio *in vivo* utilizando modelos de roedores para leucemia mostraram que o phellandrene estimula a produção de células *natural killers*, aumenta a atividade fagocítica de macrófagos e provoca a morte celular através da indução de danos ao DNA e bloqueio dos mecanismos de reparo (LIN *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2015).

### 3 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos antitumorais dos óleos essenciais nanoemulsionados de *Mentha villosa* e de *Curcuma longa* e seus compostos ativos majoritários, Carvone e  $\alpha$ -Phellandrene em linhagens celulares de mama.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a viabilidade celular a partir dos tratamentos das linhagens com as nanoemulsões e os compostos isolados;
2. Avaliar o perfil de migração das células controle e cultivadas com as nanoemulsões;
3. Avaliar o perfil de expressão gênica dos genes *MMP2*, *TIMP2*, *CDH1*, *VIM* e *ADAM33* nas linhagens controle e tratadas com os compostos isolados;
4. Avaliar a atividade de gelatinase da proteína MMP-2 nas linhagens controle e tratadas com os compostos isolados.
5. Avaliar a expressão proteica da MMP-2 nas linhagens controle e tratadas com os compostos isolados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico

Foram utilizadas a linhagem celular normal de mama – HB4a – e tumorais de mama – MCF7 e MDA-MB-231 – e melanoma – MDA-MB-435 – em cultivos controlados. As linhagens foram cultivadas com meio RPMI 1640, suplementadas com SFB 10% inativado a 55°C, contendo gamicina 40 ug/mL e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5%, 37°C. Para a linhagem MCF7 foi adicionado insulina a 3,5 mg/mL e para a linhagem HB4a além da insulina, foi adicionado hidrocortisona a 5 ug/mL. Todas as linhagens foram obtidas da ATCC.

Alíquotas de linhagens com aproximadamente 10<sup>6</sup> células/mL, congeladas em SFB 10% e DMSO 10%, foram retiradas do nitrogênio líquido (-196°C), descongeladas a 37°C, transferidas dos tubos criogênicos para garrafas com área de cultivo igual a 25 cm<sup>2</sup>, contendo o meio de cultura devidamente suplementado, e, incubadas a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado regularmente e o crescimento celular foi acompanhado. Quando se obteve uma monocamada de células aderidas à garrafa com aproximadamente 80-90% de confluência, efetuou-se a expansão da cultura através do tratamento com tripsina 0,25% (TrypLE™ Express, Gibco, Gaithersburg, MD, USA).

### 4.2 Obtenção dos óleos essenciais e produção das nanoemulsões

As mudas de *Mentha villosa* e *Curcuma longa* foram obtidas a partir do substrato orgânico Carolina II em novembro de 2014. Aproximadamente 200 mudas de cada espécie foram transplantadas para o campo em janeiro de 2015. As mudas foram cultivadas na Unidade de Ensino Aprendizagem – Plantas Medicinais do Instituto Federal Catarinense, situado no litoral Norte Catarinense, sob coordenadas geográficas 26° 23' 33,6691" S 48° 44' 18,3336" W, Altitude 10,60 m. Estas plantas foram mantidas em canteiros de 10 metros de comprimento por 1 m de largura, com espaçamento de 50 cm entre mudas.

A extração dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Produção Vegetal do Instituto Federal Catarinense (IFC) pela Msc. Amanda Chaaban, com coordenação dos Dr. John Lennon Mesquita Catão e Dr. Murilo Fazolin (Embrapa). Após a coleta, talos e folhas de *Mentha villosa*, e folhas de *Curcuma longa* foram submetidos a hidrodestilação a fresco utilizando o aparato do tipo *Clevenger*. Foram utilizadas 200 g de planta em cada destilação durante 4 horas. O composto sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi utilizado como agente desidratante para a remoção da água residual dos óleos essenciais. A Tabela 1 mostra a composição química dos óleos essenciais, realizada no Laboratório de Óleos Essenciais pela Dr. Amanda Chaaban (dados não publicados, os valores foram omitidos por estar em processo de registro de patente).

TABELA 1 – Constituição química dos óleos essenciais

Constituintes	<i>C. longa</i> (%)	Constituintes	<i>M. villosa</i> (%)
α-phellandrene		R-carvone	
ρ-mentha-2,4(8)-dieno		Dihidrocarveol	
1.8-cineole		Acetato de dihidrocarveol	
β-pineno		D-limonene	
Limoneno		Acetato de carvil	
ρ-cimeno		β -caryophyllene	
Mirceno		trans-carveol	
α-pineno		β-bourbonene	
γ-terpineno		Gamma-muurolene	
α-terpineno		cis-carveol	
δ-3-careno		L-β-pinene	
Linalol		Biciclosesquiphellandrene	
(E)-β-ocimeno		α-pinene	
terpinen-4-ol		L-4-terpineol	
Sabineno			
α-terpineol			
δ-2-careno			
α-tujeno			

Após a extração, os óleos essenciais foram submetidos a um processo de nanoemulsificação. As nanoemulsões O/A (óleo-água) foram preparadas usando o composto ativo (óleo essencial) como fase dispersa e água destilada e Tween® 80 (polissorbatato 80) como fase contínua, nas proporções de 0,05% de Tween, 2% do óleo essencial e 97,95% de água ultrapura.

A fase contínua (Tween e água destilada) foi invertida sobre a fase dispersa (fase oleosa, composto ativo) e homogeneizada em Ultra-Turrax® (T25 digital IKA®, Staufen, Alemanha) com um rotor S 25N – 18G a 9000 rpm por 1 minuto, formando uma pré-emulsão, com objetivo de potencializar a etapa subsequente. Para a obtenção da nanoemulsão, esta pré-emulsão foi submetida à homogeneização de alta pressão (homogeneizador APLAB 10 - Artepeças, Brasil) durante 20 ciclos a uma pressão de 400 bar, realizados no laboratório de Óleos Essenciais da Epagri de Itajaí em Santa Catarina pelo Dr. Fabiano Cleber Bertoldi. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Todo o procedimento de obtenção das amostras além da preparação das nanoemulsões foi realizado à temperatura controlada de 20°C em um banho termostático. O processo de nanoemulsificação tem como objetivo tornar os óleos essenciais solúveis em água.

#### 4.3 Tratamento dos cultivos

Inicialmente, as linhagens foram submetidas ao cultivo com os compostos obtidos a partir da extração dos óleos essenciais de *Mentha villosa* e *Curcuma longa*. Aproximadamente  $5 \times 10^5$  de células foram cultivadas sob condições ótimas, e diferentes concentrações dos óleos nanoemulsionados foram adicionados as culturas. Inicialmente foram testadas as concentrações 3, 15, 30, 60 e 150  $\mu\text{M}$  das nanoemulsões para a realização dos testes. Após a determinação das concentrações das nanoemulsões foram realizados em experimentos com os compostos isolados. Os compostos isolados no óleo de menta e curcuma, respectivamente, R(-)-carvone e  $\alpha$ -phellandrene (Sigma, Aldrich) foram escolhidos para a continuidade dos ensaios por se encontrarem majoritariamente nos óleos obtidos das plantas. Estes compostos foram

testados nas mesmas concentrações utilizadas dos óleos essenciais e, posteriormente, nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mM. Após os tratamentos, foram realizados experimentos de viabilidade, migração celular, bem como a extração de DNA e RNA dos controles e dos tratamentos.

#### 4.4 Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT

Para este ensaio, as células foram submetidas ao cultivo com e sem os compostos. Aproximadamente  $1 \times 10^4$  células foram transferidas para poços em placas de 96 e deixadas aderir por cerca de 12 h. Para os óleos essenciais, foram testadas as concentrações 3, 15, 30, 60 e 150  $\mu$ M. Para o carvone e o *phellandrene*, foram testadas as seguintes concentrações: 0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mM. Após o período de 24 h e 48 h, o meio das células foi aspirado e às células restantes foi adicionado o composto brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a 0,5 mg/mL e incubado em estufa de CO<sub>2</sub> por 3 h. O MTT é um composto líquido de cor amarela que, em contato com a mitocôndria, se transforma em formazan, um composto cristalino de cor roxa. Portanto, os cristais adsorvidos após o período de incubação foram solubilizados em solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância aferida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Os dados obtidos foram plotados em gráficos e os valores analisados através do *software* Prism 7.1.

A partir dos dados de viabilidade celular, foi possível calcular a contração inibitória média (IC<sub>50</sub>) de cada composto para cada linhagem celular. O IC<sub>50</sub> consiste na concentração de um fármaco necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular. Essa é uma informação importante quando se visa a aplicação dos compostos estudados no tratamento do câncer. A concentração inibitória média foi calculada através de regressão linear utilizando o *GraphPad Software*.

#### 4.5 Ensaio de Migração Celular

As células controle e tratadas foram submetidas ao ensaio de migração celular, ou *wound healing*. Para este ensaio, cerca de  $3 \times 10^5$  células foram

cultivadas em placas de 12 poços até a confluência de aproximadamente 90% e feito o risco, ou ferida, no centro da placa. A partir disso, o meio foi depletado de soro fetal e o fechamento ou não da fenda gerada foi acompanhado e fotografado por 24 e 48 horas. Para a construção dos gráficos, inicialmente foi medido a área da fenda em 0 horas. Em seguida, foram medidas as áreas do mesmo local em 24 e 48 horas e então calculado a porcentagem de cobertura da área inicial. As imagens foram analisadas por meio do *software* livre *Image J*.

#### 4.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para realização das extrações de DNA e RNA, foi utilizado o kit *All prep DNA/RNA* (Qiagen), conforme especificações do fabricante, com o qual é possível isolar as duas biomoléculas de uma mesma amostra simultaneamente. O DNA obtido foi armazenado para futuros estudos e o RNA total purificado foi então submetido à síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o kit *High Capacity* (Applied Biosystems), conforme especificações do fabricante. Para tal, foram utilizados aproximadamente 1000 ng de RNA total, 1 µl de 20X RT enzima mix e 10 µl de 2X tampão, em um volume total de 20 µl. O gene endógeno de expressão constitutiva (GAPDH) foi utilizado para verificar a qualidade da síntese de cDNA. Para a reação de PCR, foram utilizados Tampão 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 2 mM, 0,3 uM de oligo e *Taq Platinum* 1 U/uL (Invitrogen). As condições de PCR seguiram o padrão de 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturar as fitas do DNA, 56°C por 30 segundos para o anelamento dos iniciadores e 72°C por 45 segundos para extensão. Um ciclo de 72°C por 5 minutos foi utilizado ao final da reação. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,2 ug/mL.

##### 4.6.1 Análise da Expressão Gênica por RT-qPCR

Para a reação de RT-qPCR foram utilizados os cDNAs das linhagens controle e tratadas com os compostos isolados. Para as condições testadas, foi

avaliada a expressão dos genes *MMP2*, *CDH1*, *VIM*, *TIMP-2* e *ADAM33*. O gene utilizado como normalizador foi determinado após a obtenção da curva de padronização com *GAPDH*, *HPRT* e *HLPO*. O gene escolhido por não apresentar variações na expressão frente aos tratamentos foi o *HPRT*. Os oligos utilizados para a amplificação estão inseridos na tabela 2 abaixo.

Inicialmente, foi realizada a padronização dos parâmetros da reação. As diluições de iniciadores testadas foram de 150 mM, 300 mM, 600 mM e 900 mM; e o cDNA alvo foi de 1, 1:2, 1:10 e 1:50 em sistemas de 10 µl utilizando *SYBR®Green 1x* no equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems)*.

TABELA 2 – Sequências dos iniciadores utilizados nas reações de RT-qPCR

Gene	Universal (5'-3')	Reverso (5'-3')	Tamanho (pb)
<i>GAPDH</i>	CTGCACCACCAACTGCTTA	CATGACGGCAGGTCAGGTC	296
<i>HPRT</i>	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA	TCCAGCAGGTCAGCA AAGAAT	101
<i>CDH1</i>	CCCGGGACAACGTTTATT	GTCGTTACGAGTCACTTCAG	116
<i>VIM</i>	CTCGTCACCTTCGTGAATAC	GATTAGTTTCCCTCAGGTTTCAG	153
<i>MMP2</i>	AGCTCCCGGAAAAGA TTGATG	CAGGGTGCTGGCTGA GTAGAT	101
<i>TIMP2</i>	CGACATTTATGGCAA CCCTATCA	GGGCCGTGTAGATAA ACTCTATATCC	101
<i>ADAM33</i>	CAGGACCCGGAAGTACCTG	GCCACCTGAATGTCCAGAG	150

Os dados obtidos foram submetidos ao método estatístico  $\Delta\Delta C_t$ , um dos modelos mais utilizados para comparar níveis de expressão gênica entre diferentes condições de tratamento. Neste cálculo, o  $C_t$  obtido para um gene-alvo é descontando da média dos  $C_t$ s dos normalizadores ( $\Delta C_t$ ). Este valor, por sua vez, é utilizado para fazer a diferença entre controle e tratamento ( $\Delta\Delta C_t$ ). A expressão do gene é fornecida pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os valores de  $C_t$  obtidos foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA e considerados significativos se  $p < 0,05$ .

#### 4.7 Análise da atividade de metaloprotease de MMP-2 por zimografia

A atividade de metaloprotease da MMP-2 foi avaliada utilizando a técnica de zimograma (KLEINER E STETLER-STEVENSON, 1994). Esta técnica consiste de uma eletroforese em gel de poliacrilamida impregnado com um substrato que será degradado pela proteína que se quer analisar. O substrato utilizado para avaliar a atividade da enzima MMP-2 foi a gelatina. Foram testados os sobrenadantes das culturas da linhagem MDA-MB-231 controle e tratada com R-carvone ou  $\alpha$ -*phellandrene* por 48h. Como controle positivo, utilizou-se o sobrenadante da linhagem PMC42 que expressa grandes quantidades de MMP-2. Ao final de cada tratamento, um mililitro de sobrenadante foi coletado, transferido para um tubo tipo *ependorf* e adicionado 500  $\mu$ l de etanol absoluto. Após aproximadamente 1h a  $-80^{\circ}\text{C}$ , o tubo foi centrifugado por 10000 x g por 10 minutos e o precipitado foi lavado três vezes com tampão TBST 1x gelado. A amostra foi ressuspensa em tampão de amostra (0,075 g Tris, 0,2 g SDS em 10 mL de água destilada, pH 6,8) não contendo agentes redutores e aplicado em SDS-PAGE 8% contendo gelatina 0,1% pré-aquecida a  $60^{\circ}\text{C}$ . Após a eletroforese em tampão adequado (Tris 25 mM, 250 mM de Glicina e SDS 0,1%), o gel foi lavado duas vezes em TritonX 2,5% pré-aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Em seguida o gel foi acondicionado em tampão de incubação ( $\text{CaCl}_2$  5 mM e  $\text{ZnSO}_4$  1  $\mu\text{M}$ ) a  $37^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 48 h. A atividade de protease foi visualizada através de bandas descoloridas no gel, após a coloração e descoloração simultânea com *coomassie blue* conforme o protocolo (LEBER E BALKWILL, 1997).

#### 4.8 Imunodeteção de proteínas ou *western blotting*

Para a análise das proteínas da linhagem MDA-MB-231 controle e tratada com R-carvone e  $\alpha$ -*phellandrene* por 48 horas, as células foram cultivadas em placas de 100  $\text{mm}^2$  até atingir confluência de aproximadamente 80%. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS 1X gelado e adicionado tampão de lise RIPA (50 mM Tris-HCl, pH; 0,5% Deoxicolato; 150 mM NaCl, 0,1% SDS), contendo inibidor de protease (*Halt Protease and Phosphatase*

*Inhibitor Cocktail – Thermo Fisher*) e EDTA 1 mM. Posteriormente, as células foram raspadas com um *scraper* e o lisado foi passado para um tubo de 1,5 mL, centrifugados a 10.000 X g por 10 minutos a 4°C e recolhido o sobrenadante. A quantificação proteica foi determinada por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A absorbância das amostras foi lida a 595 nM em espectrofotômetro e a concentração de proteínas foi determinada a partir da curva obtida por regressão linear dos valores padrões de BSA.

Para a reação de imunodeteção, as amostras quantificadas foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol) e aquecidas a 100°C durante 10 minutos antes da aplicação no gel para a eletroforese. As eletroforeses de proteínas foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de PVDF (*Hybond ECL- GE Healthcare*), ativada anteriormente com metanol. A transferência foi realizada com o tampão de transferência (25 mM Tris HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol, 0,037% SDS) a 250 mA por 1 hora.

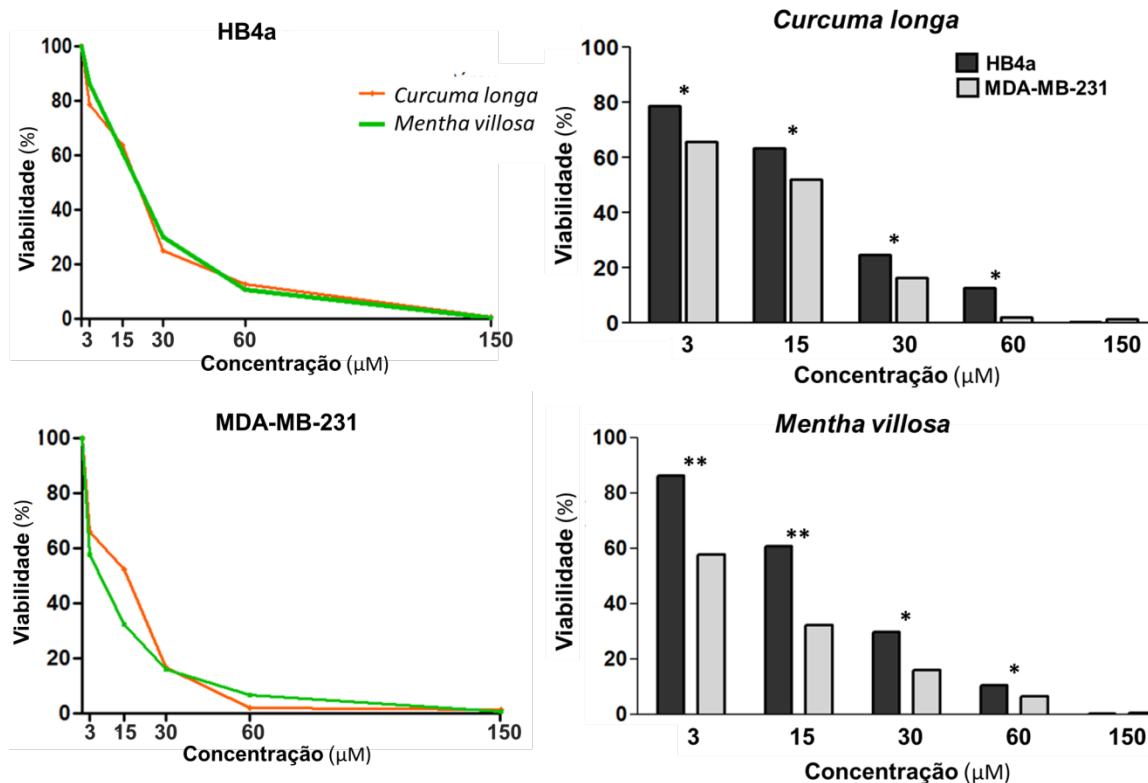
Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST (Tris pH 7,6; 2,42g/L; NaCl 8g/L; tween 20 1mL/L) por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST três vezes e incubada com 5 mL de solução de leite 5% TBST com o anticorpo primário: 1:1000, para o anticorpo anti-MMP-2, e 1:5000, para o anticorpo anti- $\beta$  actina, sendo mantida sob agitação durante 18 horas a 4°C. O anticorpo primário foi retirado por meio de três lavagens sucessivas com TBST, por 10 minutos cada. O anticorpo secundário foi o anti-mouse IgG HRP (*Sigma*), de concentração 1 mg/mL, diluído 1:5000 vezes. Depois de cinco lavagens com TBST, a membrana contendo a reação antígeno-anticorpo foi revelada com o reagente *Luminata Forte Western HRP substrate* (Millipore) utilizando filme de Raio X seguido de revelação com tampões revelador e fixador.

Para os ensaios de MMP-2, foram utilizados extratos proteicos na concentração de 20  $\mu$ g de proteínas e para E-caderina e  $\beta$ -actina, foram utilizados 5  $\mu$ g.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio de viabilidade celular

Com o objetivo de avaliar o efeito dos óleos essenciais sobre as linhagens normal de mama (HB4a) e tumoral altamente invasiva (MDA-MB-231), foi realizado o ensaio de viabilidade pelo método do MTT. Após o período de 24 horas de tratamento com os compostos, foram obtidos os seguintes resultados plotados nos gráficos abaixo (Figura 5).

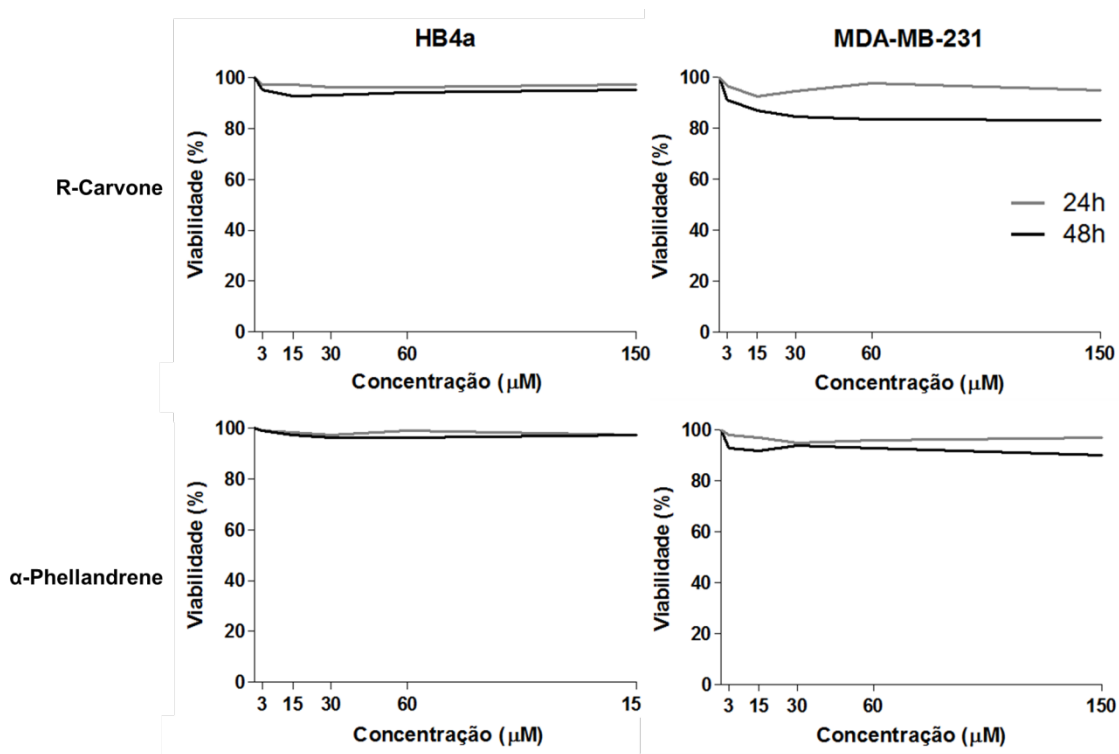


**Figura 5 – Ensaio de viabilidade celular das linhagens HB4a e MDA-MB-231 e seus tratamentos.** Os gráficos representam a porcentagem de células viáveis em relação ao controle das linhagens HB4a e MDA-MB-231 submetidas a tratamentos com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Curcuma longa* e *Mentha villosa*, por um período de 24h. O \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .

A partir dos resultados é possível observar que ambos os óleos essenciais apresentaram efeito citotóxico dose-dependente nas linhagens testadas. Para todas as concentrações testadas, houve maior redução na viabilidade celular da linhagem tumoral MDA-MB-231 em relação à normal,

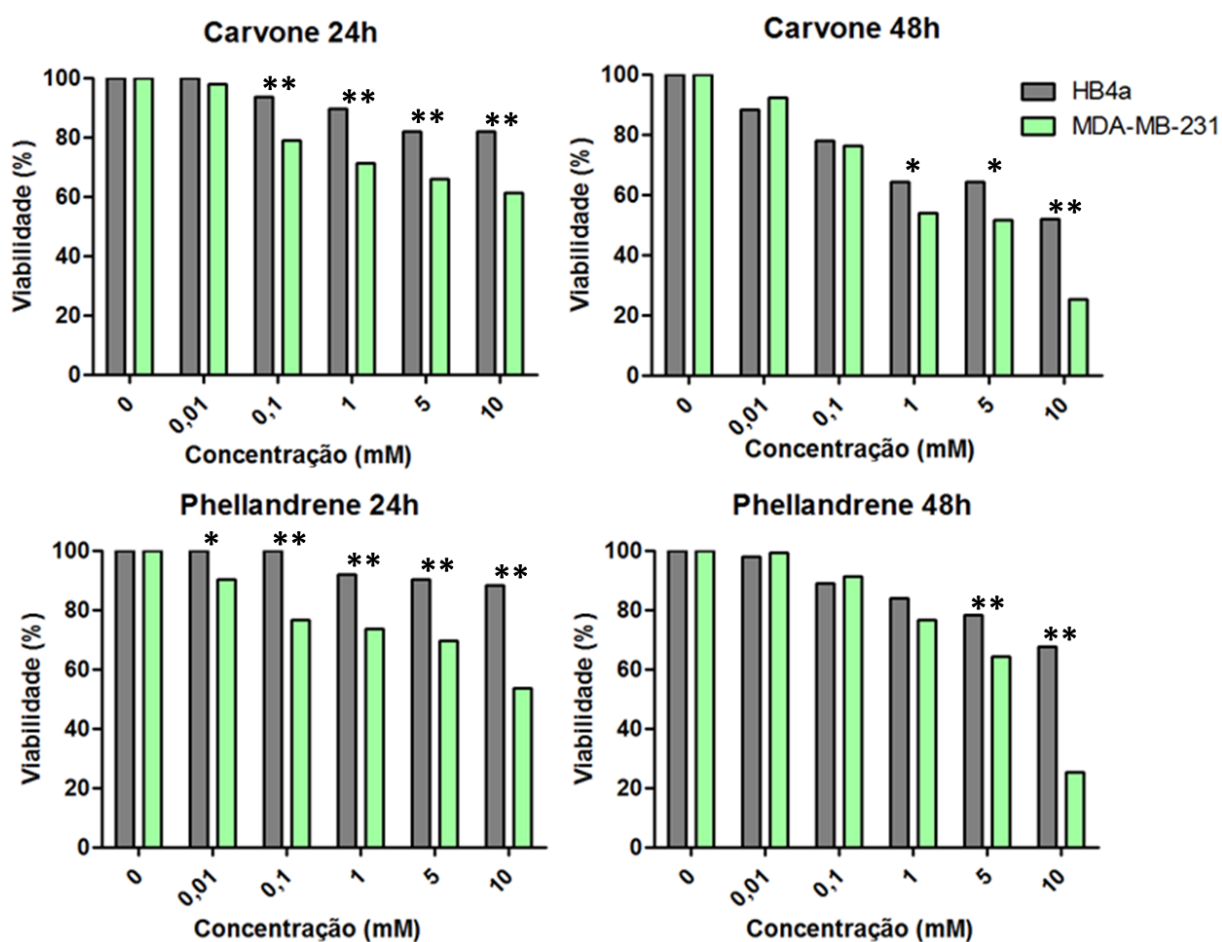
HB4a. Apenas para os tratamentos a 150  $\mu\text{M}$  não foram observadas células viáveis após 24 h. Os resultados mostraram que somente os tratamentos com duração de 24 h foram viáveis uma vez que estas células, quando submetidas ao cultivo por 48 h não apresentavam células viáveis sob nenhuma concentração testada. A partir destes resultados, a concentração de 15  $\mu\text{M}$  foi escolhida para os ensaios e tratamentos posteriores, principalmente por apresentar baixa toxicidade para a linhagem normal ao mesmo tempo alta para a linhagem tumoral.

A partir da obtenção de efeito sobre as linhagens testadas, os compostos majoritários encontrados nos óleos foram utilizados nos próximos ensaios. O objetivo foi avaliar se o composto sozinho apresentaria o mesmo efeito obtido com as nanoemulsões. Para o ensaio de viabilidade, foram utilizados o R-carvone, que compõem 52% do óleo essencial da menta, e  $\alpha$ -phellandrene, que compõem 42% do óleo de cúrcuma. Inicialmente, foi feita uma curva utilizando concentrações dos compostos proporcionais àquelas presentes nos óleos essenciais (Figura 6).



**Figura 6 – Ensaio de viabilidade celular das linhagens HB4a e MDA-MB-231 tratadas com R-carvone e  $\alpha$ -phellandrene.** Os gráficos representam a porcentagem de células viáveis em relação ao controle das linhagens HB4a e MDA-MB-231 submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de R-carvone e  $\alpha$ -phellandrene, por um período de 24h e 48h.

Nestas condições testadas somente com os compostos isolados não foi possível observar diferenças significativas na viabilidade celular tanto entre as concentrações, quando entre as linhagens. Assim, este ensaio foi realizado novamente utilizando novas concentrações dos princípios ativos isolados com a finalidade de se obter diferenças significativas na morte celular nestes tratamentos. Foram testadas as concentrações 0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mM, como mostrado na Figura 7.



**Figura 7 – Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT.** Os gráficos representam a porcentagem de células viáveis em relação ao controle das linhagens HB4a e MDA-MB-231 submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de R-carvone e  $\alpha$ -phellandrene, por um período de 24h e 48h. O \* significa  $p < 0,05$  e \*\* significa  $p < 0,01$ .

Após este experimento foi possível observar que tanto o R-carvone quanto o  $\alpha$ -phellandrene apresentaram efeito citotóxico frente às duas linhagens. Para o R-carvone, os efeitos só foram observados em

concentrações acima de 0,1 mM em 24h e 1 mM em 48h. Já para o *phellandrene*, concentrações maiores do que 0,01 mM apresentaram efeitos sobre a viabilidade em 24h. Em 48h, apenas as concentrações de 5 e 10 mM causaram diminuição da viabilidade. Ambos os compostos apresentaram maiores efeitos sobre as células tumorais em relação às normais, sobretudo nas concentrações de 5 e 10 mM. A partir destes gráficos, a concentração escolhida para tratamentos posteriores foi de 5 mM.

A partir destes resultados, foi calculada a concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) para todos os compostos tratados por 48h, como mostrado na Tabela 3.

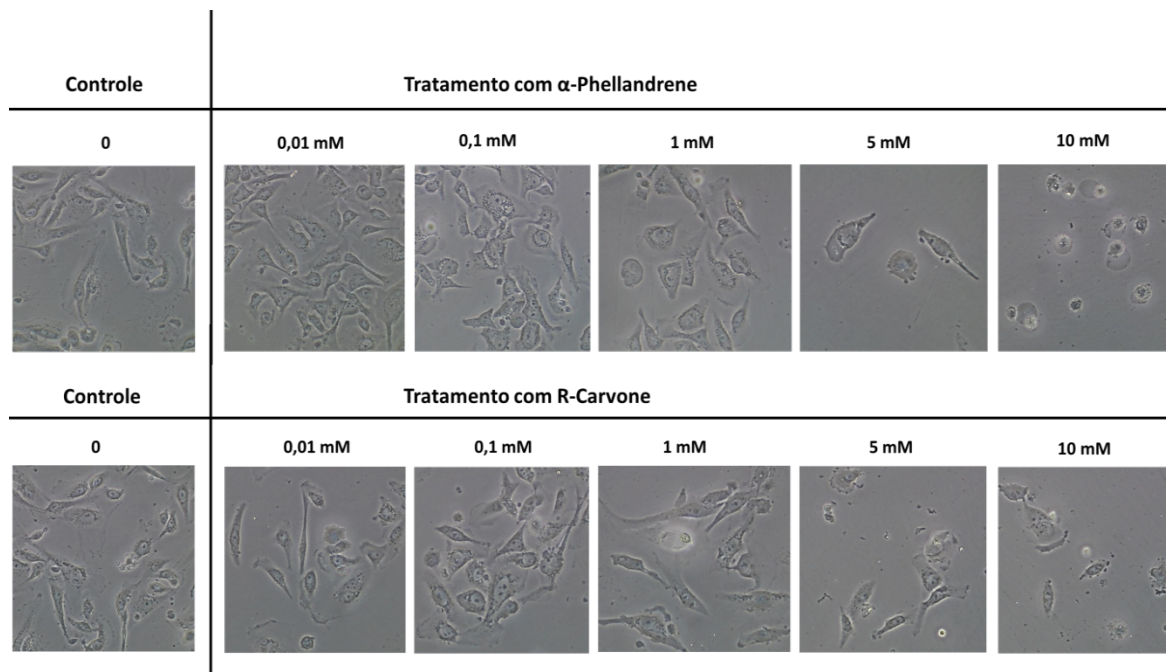
TABELA 3 – Concentração Inibitória Média (IC<sub>50</sub>) dos compostos

	IC <sub>50</sub> (µM)	
	HB4a	MDA-MB-231
<i>Curcuma longa</i>	22,7	20,3
<i>α-phellandrene</i>	9,5 x 10 <sup>3</sup>	5,6 x 10 <sup>3</sup>
<i>Mentha villosa</i>	23,7	17
R-carvone	13,9 x 10 <sup>3</sup>	8,2 x 10 <sup>3</sup>

Obs. Os dados representam valores de IC<sub>50</sub> em µM, obtidos através de regressão linear utilizando o software GraphPad.

Os valores de IC<sub>50</sub> foram maiores para a linhagem tumoral em relação à normal para todos os compostos testados. Os valores encontrados para os óleos essenciais sob a conformação de nanoemulsões foram mil vezes menores do que os dos compostos isolados. Isto indica que são necessárias concentrações muito maiores dos compostos isolados para provocar o mesmo efeito que os óleos essenciais nas linhagens testadas.

Utilizando as mesmas concentrações dos compostos majoritários isolados, foi realizada uma análise morfológica das células da linhagem MDA-MB-231 submetidas às diferentes concentrações de R-Carvone e *α*-Phellandrene por 48 horas (Figura 8).

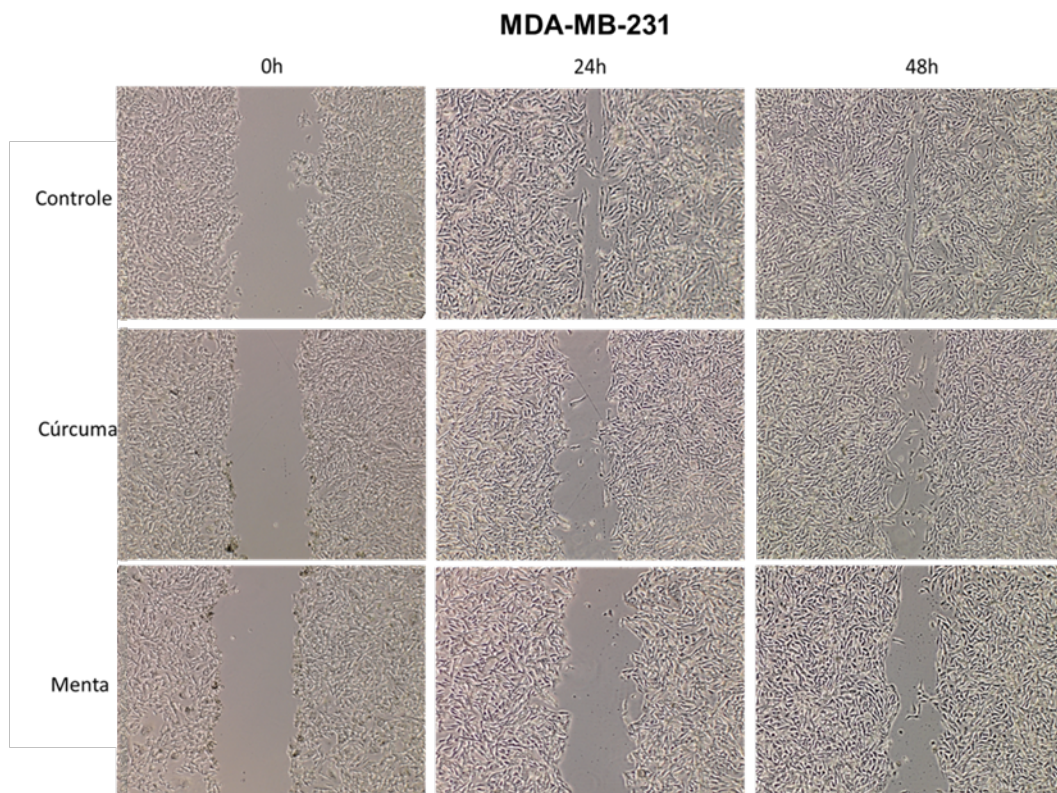
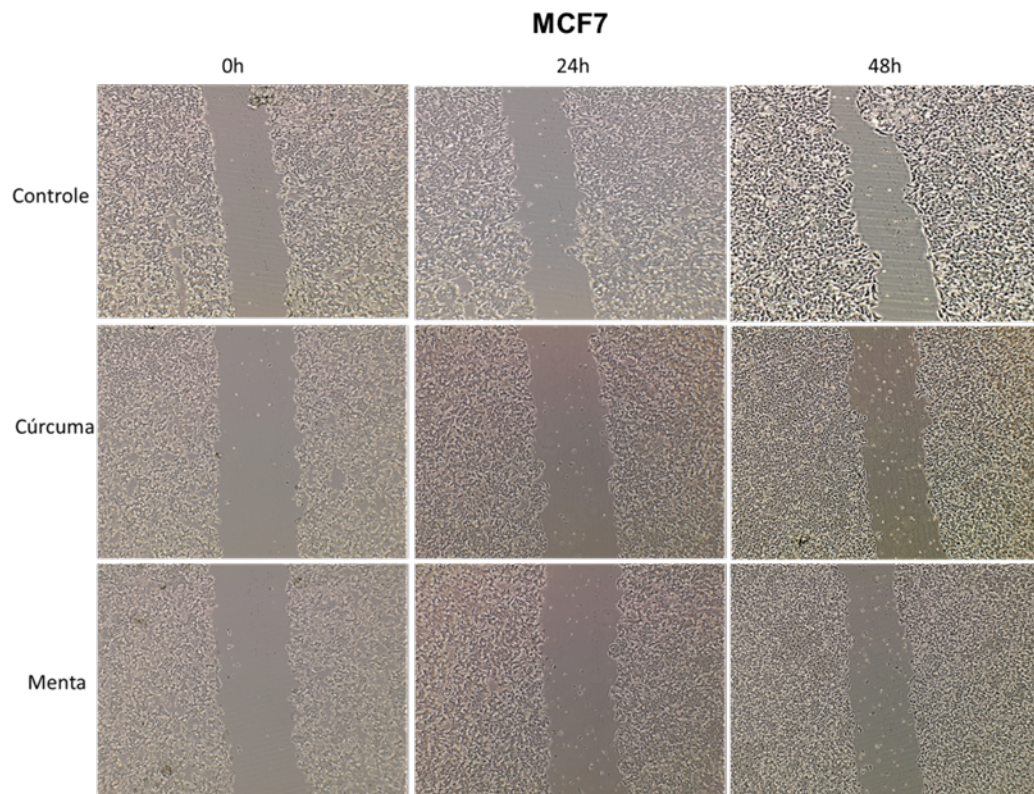


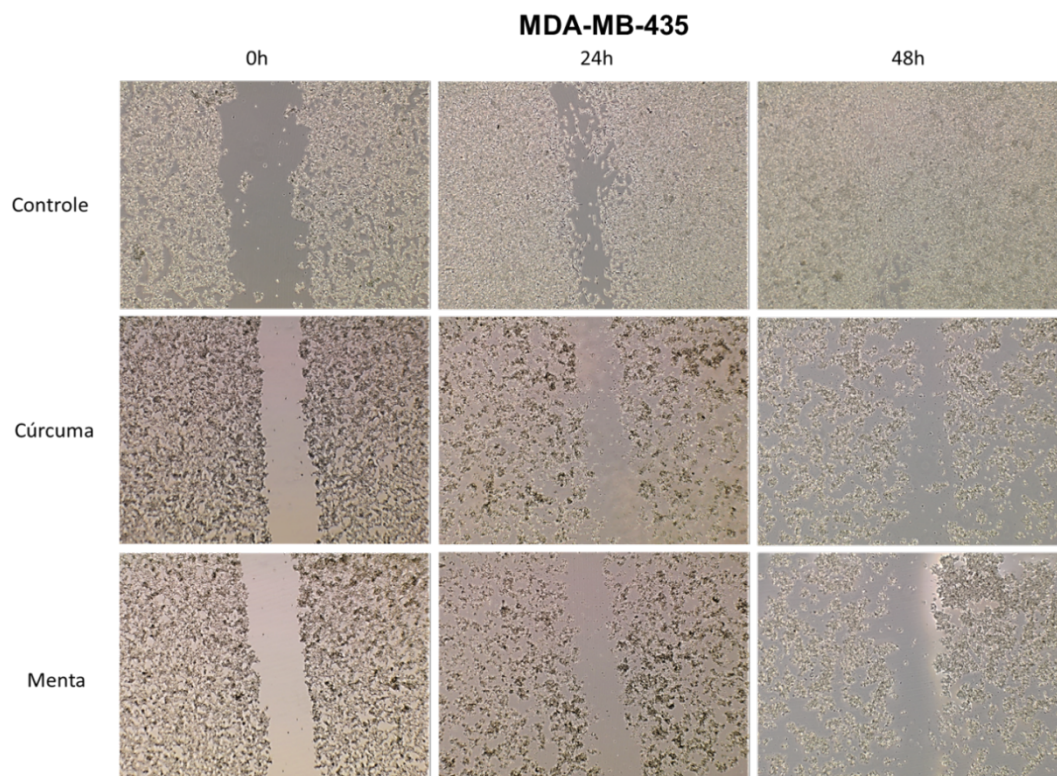
**Figura 8 – Análise morfológica da linhagem MDA-MB-231 exposta a diferentes concentrações de R-carvone e  $\alpha$ -phellandrene por 48 horas.** Na imagem, é possível observar que os tratamentos com os compostos induzem modificações fenotípicas nas células, que se tornam mais arredondadas e podem sofrer rompimento das membranas.

Foi observado um efeito dose-dependente para os dois compostos, mais evidente a partir de 1 mM. Foram percebidas alterações nos tamanhos e nos formatos das células, que deixaram de ser alongadas e passaram a ter formato arredondado. Em concentrações mais altas, houve a formação de vesículas no citoplasma, perda da estrutura do núcleo e, em 10 mM, o rompimento de membrana das células.

## 5.2 Ensaio de migração

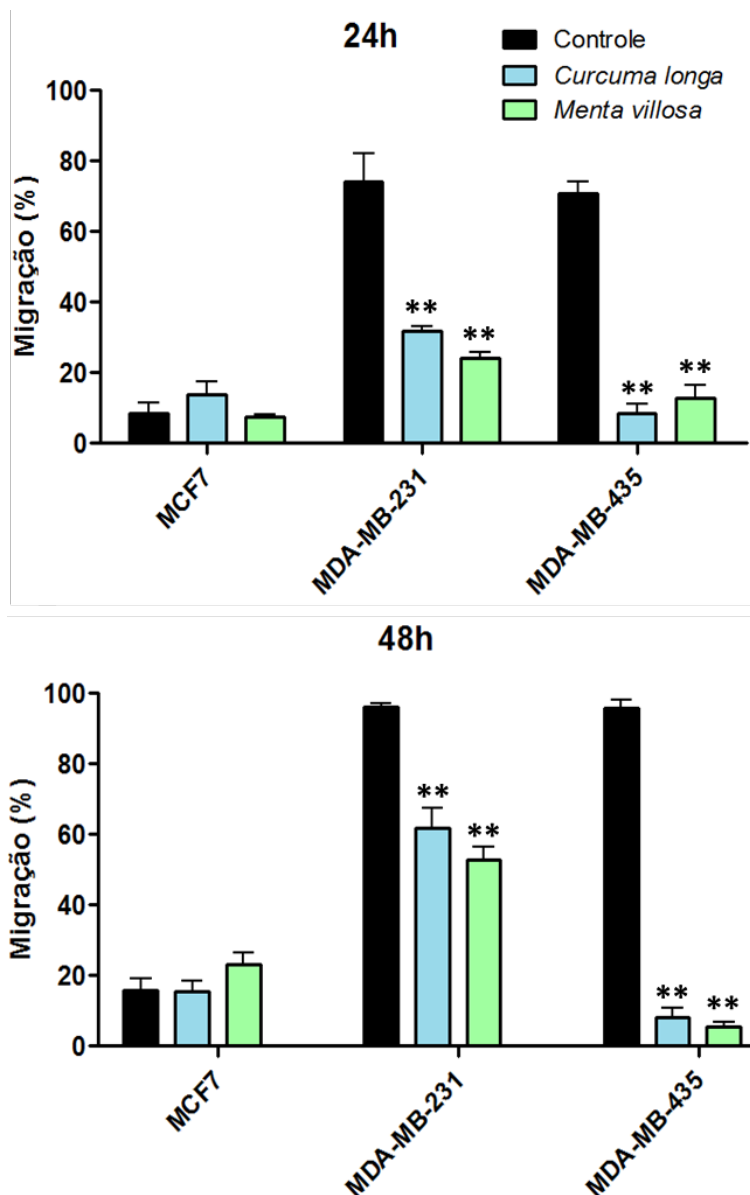
As linhagens tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF7) e melanoma (MDA-MB-435) foram avaliadas quanto ao perfil de migração quando submetidas ao cultivo com os óleos essenciais em nanoemulsões (Figura 9).





**Figura 9 – Perfil de migração das linhagens MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-435 controle e tratadas com óleos essenciais de *Curcuma longa* e *Mentha villosa*.** Na imagem, é possível perceber que os tratamentos com os óleos diminuem a migração celular das linhagens tumorais MDA-MB-231 e MDA-MB-435. A linhagem MCF7, que não apresenta perfil migratório, não demonstrou diferenças entre o controle e os tratamentos.

Através das imagens, é possível perceber que os cultivos das linhagens com óleos essenciais provocaram alterações significativas para reduzir a migração celular, conforme análise estatística. A linhagem MCF7 não apresentou diferenças significativas entre o controle e os tratamentos como esperado pela baixa taxa de invasão que esta linhagem apresenta. Para a MDA-MB-231 e MDA-MB-435, as linhagens controles foram capazes de fechar a abertura em 48 horas, enquanto os tratamentos não. Para a avaliação estatística, estes dados foram organizados em forma de gráficos (Figura 10).

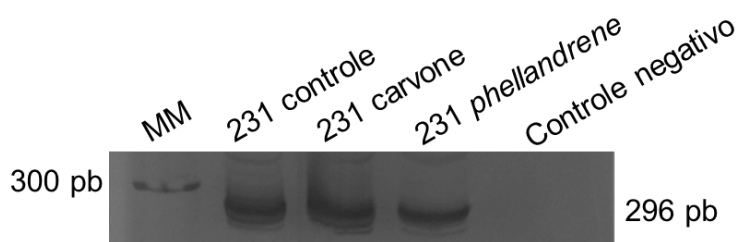


**Figura 10 – Gráfico das taxas de migração celular após tratamentos.** Os gráficos representam a medida das áreas das taxas de migração das linhagens MCF7, MDA-MB-231 e MDA-MB-435 sem e com os óleos de *Mentha* e *Curcuma*. \*\* significa  $p < 0,01$ .

A partir dos resultados, pode-se observar que os tratamentos não provocaram alterações significativas da migração da linhagem MCF7 enquanto a MDA-MB-231 apresentou uma redução de migração média de 50% em 24 horas e de 40% em 48 horas. Para a linhagem MDA-MB-435, essa redução média foi de 60% em 24 horas e 85% em 48 horas. Estes resultados mostram que os tratamentos induziram alterações fenotípicas destas células para um perfil menos migratório, e, conseqüentemente, menos agressivo.

### 5.3 Análise da expressão gênica

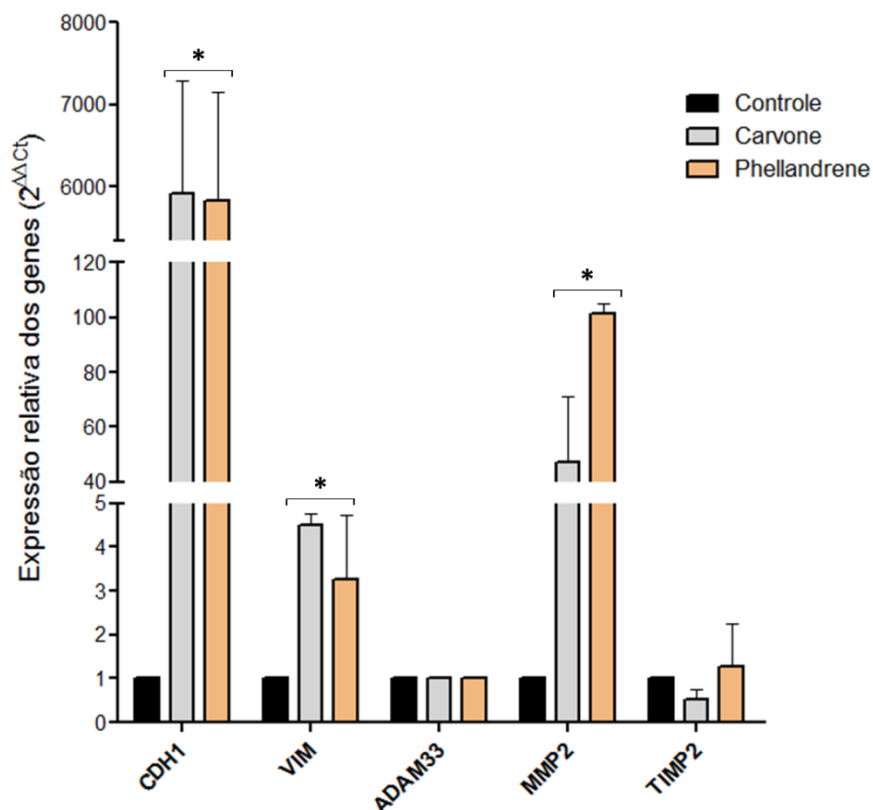
Após a síntese do cDNA a partir do RNA total extraído da linhagem MDA-MB-231 controle e tratada com R-carvone e  $\alpha$ -*phellandrene*, foi realizada a reação de PCR utilizando iniciadores para o gene de expressão constitutiva *GAPDH*, como mostrado na Figura 11. Essa reação é utilizada para verificar a qualidade do cDNA, indicada pela amplificação da região de 296 pb.



**Figura 11 – RT-PCR do gene constitutivo *GAPDH* para as condições controle e tratamentos da linhagem MDA-MB-231.** MM – marcador de massa molecular; controle negativo – PCR sem cDNA. Foram testadas as condições sem tratamento (231 controle) e tratadas por 48 horas com os compostos R-carvone e  $\alpha$ -*phellandrene*. As bandas correspondem ao fragmento amplificado esperado de 296 pb.

A partir do cDNA sintetizado, foi realizada uma RT-qPCR para a análise da expressão relativa dos genes *CDH1*, *VIM*, *ADAM33*, *MMP2* e *TIMP2*. Foi utilizado como normalizador o gene endógeno *HPRT*. Através de padronização, foi escolhida a concentração de 900 nM de iniciadores para os genes *CDH1* e *VIM* e 600 nM para os demais. A curva de diluição do cDNA mostrou a diluição 1:2 em água com os melhores resultados. Para essas condições, a eficiência dos iniciadores ficou entre 95 e 105%.

Foi avaliada a expressão dos genes *CDH1*, *VIM*, *ADAM33*, *MMP2* e *TIMP2*, utilizando como normalizador o gene endógeno *HPRT*, mostradas na Figura 12.

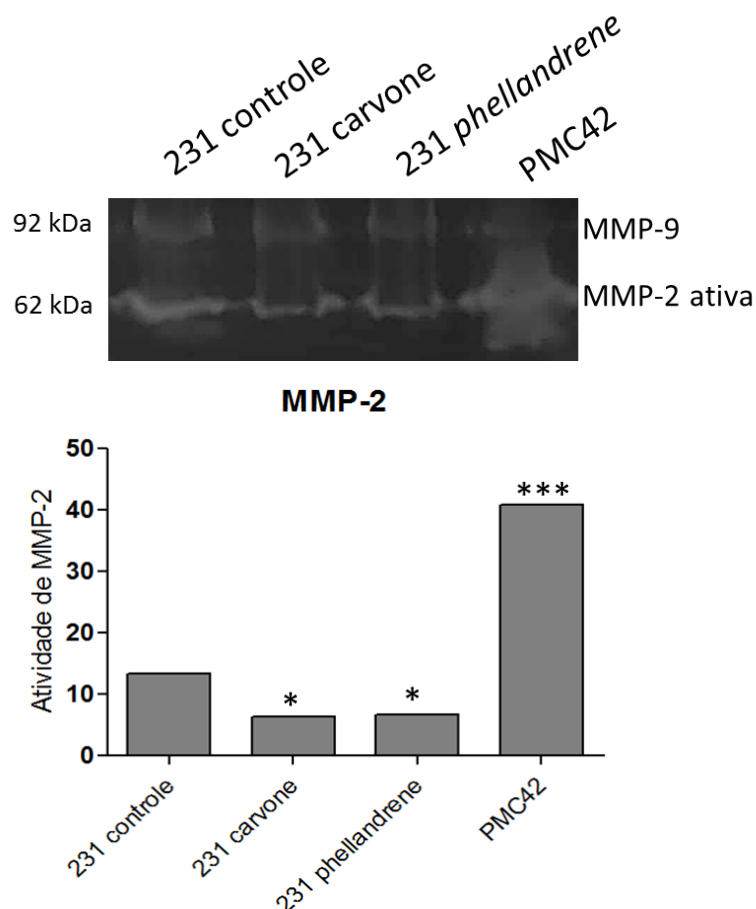


**Figura 12 – Expressão gênica de diferentes genes da linhagem MDA-MB-231 e seus tratamentos.** No gráfico, o valor de expressão igual a 1 indica que a célula não expressa o gene. O \* significa  $p < 0,05$ .

Este é um modelo de gráfico que representa a expressão relativa dos genes, calculadas a partir de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde o nível de expressão do controle é indicada pelo valor 1. A partir deste gráfico, é possível observar que os tratamentos com R-carvone e  $\alpha$ -phellandrene provocaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão dos genes *VIM*, *MMP2* e *CDH1*, chegando a um aumento de mais de 5000 vezes. A linhagem MDA-MB-231 não expressa o gene e a proteína ADAM33, e os resultados mostram que os tratamentos não provocaram alteração na expressão deste gene. Quanto ao gene *TIMP2*, que codifica uma proteína envolvida na regulação da MMP-2, também não foram observadas alterações significativas, embora se observe uma pequena redução no tratamento da 231 com o R-Carvone.

#### 5.4 Ensaio de atividade de MMP-2 por zimografia

A atividade da proteína MMP-2 foi avaliada através da técnica de zimograma. Esta técnica avalia não só a presença da proteína, mas também sua atividade como gelatinase (FIGUEIRA *et al.*, 2009). Foram avaliados os sobrenadantes da linhagem MDA-MB-231 sem tratamentos e tratadas com os compostos isolados a 5 mM. A linhagem PMC42 foi utilizada como controle positivo, uma vez que expressa MMP-2 em grandes quantidades (Figura 13).



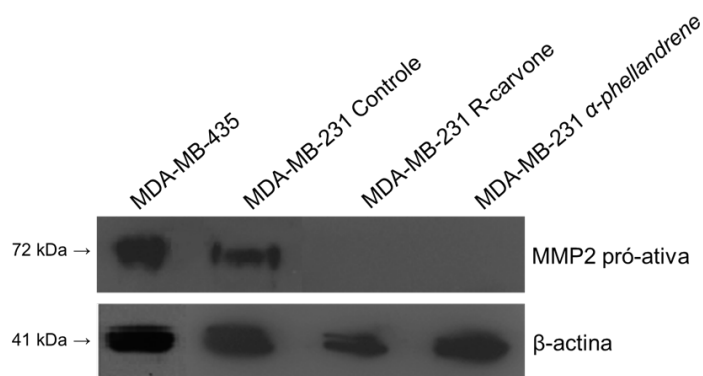
**Figura 13 – Zimograma da linhagem MDA-MB-231 controle e seus tratamentos.** Foram testadas as condições controle e tratada com R-carvone e  $\alpha$ -*phellandrene* por 48h. A linhagem PMC42 foi utilizada como controle positivo. As bandas correspondem às proteínas MMP-9 (92 kDa) e MMP-2 ativa (62 kDa). O gráfico mostra a atividade da proteína MMP-2. \* significa  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,01$ .

A linhagem MDA-MB-231, tanto controle quando tratada com carvone e *phellandrene* por 48h, foi capaz de produzir as proteínas MMP-2 na sua forma ativa (62k Da) e MMP-9 (92 kDa). Utilizando um *software* para medir a

intensidade de banda, foi possível demonstrar que os tratamentos provocam a diminuição na atividade da MMP-2 quando comparada ao controle.

### 5.5 Análise da expressão proteica de MMP-2

Para a análise da expressão da proteína MMP-2, foram obtidos os extratos proteicos totais das células controle e tratadas com R-carvone e  $\alpha$ -phellandrene por 48 horas. A partir destes, foi realizado o *western blot* (Figura 14). Como a linhagem de melanoma MDA-MB-435 apresenta alta expressão de MMP-2, ela foi utilizada como controle positivo neste ensaio. A proteína de expressão constitutiva  $\beta$ -actina (41 kDa) foi utilizada com controle da qualidade dos extratos proteicos.



**Figura 14 – *Western blot* para análise da expressão proteica de MMP-2 na linhagem MDA-MB-231 e seus tratamentos.** A linhagem MDA-MB-435 foi utilizada como controle positivo da expressão de MMP-2. Foram analisadas as proteínas MMP-2 pró-ativa (acima) e a proteína de expressão constitutiva  $\beta$ -actina (abaixo).

A partir deste resultado, foi possível demonstrar que os tratamentos com os compostos isolados por 48 horas fazem com que a célula deixe de expressar MMP-2 pró-ativa, uma vez que ela está presente nas células não tratadas. Estes resultados corroboram com o ensaio de atividade desta proteína, no qual foi observado uma diminuição da atividade de gelatinase dos tratamentos.

## 6 DISCUSSÃO

A utilização de produtos naturais tem sido a estratégia mais bem sucedida para a descoberta de novos medicamentos usados na terapia contra o câncer. Neste contexto, os óleos essenciais e os compostos isolados obtidos a partir deles mostram um grande potencial (BEZERRA *et al.*, 2008). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antitumoral dos óleos essenciais nanoparticulados de *Curcuma longa* e *Mentha villosa*, assim como de seus compostos majoritários,  $\alpha$ -*phellandrene* e R-carvone, respectivamente.

Inicialmente, foram realizados ensaios de viabilidade utilizando as linhagens normal de mama (HB4a) e tumoral triplo-negativa (MDA-MB-231). Foi possível demonstrar que tanto os óleos essenciais nanoemulsionados, quanto com os compostos isolados possuem um efeito dose-dependente e que a redução da viabilidade é maior nas células tumorais em relação às normais (Figuras 5 e 7). Este resultado é de grande importância, uma vez que fármacos com ação seletiva para células tumorais reduzem os efeitos colaterais adversos associados à terapia contra o câncer.

Foi calculado o valor de IC<sub>50</sub> para cada tratamento (Tabela 3), que corresponde à concentração necessária do fármaco para reduzir a viabilidade celular em 50%. Para os óleos essenciais, esse valor ficou entre 17 e 23  $\mu$ M, enquanto para os compostos isolados foi de 5 a 13 mM, o que indica que os óleos possuem atividade em concentrações muito mais baixas. Este mesmo resultado foi obtido por Amaral (2015) quando comparou os efeitos do óleo essencial de *M. villosa* com o composto óxido de piperonita. Isto pode ocorrer porque os óleos apresentam uma composição complexa e, diversas vezes, a ação sinérgica ou complementar entre seus constituintes determina sua atividade (BHALLA *et al.*, 2013). O óleo essencial de *Guatteria pogonopus*, por exemplo, apresenta atividade antitumoral superior a seus compostos isolados *in vivo* e *in vitro*, provavelmente devido ao sinergismo entre as moléculas (FONTES *et al.*, 2013). Neste trabalho, este efeito observado nos óleos essenciais pode ser ainda devido ao processo de nanoencapsulamento, pois ele pode aumentar a solubilidade e a permeabilidade dos compostos à membrana celular, além de interferir na liberação e degradação do fármaco, potencializando seu efeito (KREUTER, 2001; SOBRAL *et al.*, 2012).

Foi realizado uma análise morfológica da linhagem MDA-MB-231 exposta a diferentes concentrações de  $\alpha$ -*phellandrene* e R-carvone, onde foi possível observar alterações fenotípicas nas células, como alterações no formato e no núcleo, formação de vesículas no citoplasma e rompimento da membrana plasmática (Figura 8). Essas mesmas alterações foram observadas por Patel e Thakkar (2014) para esta mesma linhagem exposta a L-carvone, e estes autores sugerem a apoptose como mecanismo de morte celular predominante. A partir destes resultados, foram escolhidas as concentrações de óleos essenciais (15  $\mu$ M) e compostos isolados (5 mM) a serem utilizadas nos demais ensaios. Para os compostos isolados, esta concentração se mostrou acima do que se encontra descrito na literatura, com IC<sub>50</sub> de aproximadamente 1 mM (ABDESLAM *et al.*, 2012).

O processo de metástase é responsável por cerca de 90% das mortes relacionadas ao câncer de mama (SETHI E KANG, 2011). Seu início se dá a partir do momento em que células tumorais se desprendem do tumor primário e migram em direção a outros tecidos (YILMAZ E CHRISTOFORI, 2010). Neste contexto, a capacidade de migração celular é determinante para um melhor ou pior prognóstico. O perfil de migração celular das linhagens tratadas com os óleos essenciais demonstra uma inibição significativa da migração para as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-435 (Figura 9). Para a linhagem MCF7, não foram observadas diferenças significativas, pois esta é uma linhagem não-invasiva e menos agressiva, que apresenta taxas de migração muito baixas (PEREIRA *et al.*, 2014).

Para que a célula possa deixar o tumor e entrar em metástase, algumas alterações são necessárias, compondo um processo chamado transição epitélio-mesênquima (TEM). A conversão de células epiteliais em mesenquimais depende de uma série de eventos moleculares já descritos na literatura: perda de adesão célula-célula, resistência a apoptose e aquisição de propriedades migratórias e invasivas (SERRANO-GOMEZ *et al.*, 2016). Tendo isto em vista, foi avaliado o perfil de expressão de genes relacionados à TEM na linhagem MDA-MB-231, que possui um fenótipo mesenquimal, agressivo e altamente invasivo (HUTH *et al.*, 2017). Os tratamentos com R-carvone e  $\alpha$ -*phellandrene* provocaram alteração na expressão dos genes *CDH1*, *VIM* e *MMP2* (Figura 12).

A principal alteração na expressão gênica observada (Figura 14) foi para o gene *CDH1*, que apresentou um aumento de aproximadamente 6000 vezes nos tratamentos em relação ao controle. Este gene codifica para a proteína E-caderina, uma molécula de adesão célula-célula encontrada classicamente em células com características epiteliais (TAM; WEINBERG, 2013). A linhagem MDA-MB-231 expressa níveis muito baixos ou basais desta proteína e o aumento da sua expressão nos tratamentos corrobora com o perfil de migração (Figura 10). Isto indica que a inibição da migração celular está, possivelmente, associada à uma maior adesão celular (TAM; WEINBERG, 2013).

Os genes *VIM* e *MMP2* estão associados a um perfil mais mesenquimal e invasivo, portanto, mais maligno. A proteína metaloprotease de matriz 2 (MMP-2) tem a função de degradação da matriz extracelular, permitindo a migração das células tumorais para novos tecidos. Foi observado um aumento de 4 vezes na expressão deste gene nos tratamentos em relação ao controle. Apesar do aumento proeminente de MMP-2, não houve alterações significativas na expressão de TIMP-2 (Figura 12). Isto pode indicar que as baixas concentrações de TIMP-2 não são suficientes para permitir a ativação adequada das MMP-2, fazendo com que a atividade desta enzima se encontre comprometida (VALACCA *et al.*, 2015). Um mecanismo de regulação da expressão de MMP-2 bem descrito é o micro-RNA de interferência miR-29b, que já foi relacionado a menores níveis de expressão em câncer de mama, hepático e de próstata (LI E LI, 2013; FANG *et al.*, 2011). Ainda, esta proteína possivelmente está sujeita a outros mecanismos de regulação pós-transcricional e traducional que poderiam também serem influenciados pela ação dos compostos aqui testados. Neste caso, seriam necessários novos ensaios para determinar a potencial atuação deste ou de outros micro-RNAs.

Estes resultados, entretanto, não corroboram com o ensaio de atividade da MMP-2, o qual indica uma menor atividade de gelatinase nos tratamentos (Figura 13). Isto pode estar relacionado ao eixo de ativação desta proteína, que envolve MMP-2, MMP-14 e o inibidor tecidual de metaloprotease do tipo 2 (TIMP-2). Para que a ativação ocorra, uma molécula de TIMP-2 se liga a uma MMP-14 presente na superfície da célula. A formação do complexo MMP-14/TIMP-2 permite a ligação de uma pro-MMP-2, que é clivada e ativada (LI *et al.*, 2017). Entretanto, em altas concentrações, TIMP-2 funciona como um

inibidor das MMPs, ligando-se ao sítio catalítico, impedindo a formação do eixo de ativação e inibindo sua atividade (BERNARDO E FRIDMAN, 2003).

Os resultados de expressão gênica também demonstram um aumento tanto de proteínas mesenquimais (vimentina e MMP-2), quanto epiteliais (E-caderina). Entretanto, quando estudamos o fenótipo das células tratadas, é observada uma tendência ao fenótipo epitelial e menos invasivo. Este perfil heterogêneo já foi relatado na literatura durante a TEM, no qual existem estágios intermediários em que proteínas e características classicamente epiteliais e classicamente mesenquimais são encontradas simultaneamente em um grupo celular (CARDENAS *et al.*, 2014).

Na análise da expressão proteica de MMP-2 (Figura 14), a proteína não foi detectada nos tratamentos. A linhagem MDA-MB-231 expressa MMP-2 e isto está relacionada ao seu alto potencial invasivo e migratório (ZHANG *et al.*, 2016). Este resultado corrobora com o ensaio de atividade, onde foi observado uma diminuição da atividade de gelatinase (Figura 13). Este mesmo efeito já foi observado para diversas moléculas isoladas a partir de óleos essenciais, como a curcumina (CHEN *et al.*, 2015) e o D-limonene (YU *et al.*, 2017), que é um composto relacionado à via de síntese do R-carvone.

A MMP-2 é uma enzima produzida e secretada pela célula na sua forma inativa (ou pró-ativa), sendo ativada extracelularmente. Portanto, as proteínas observadas no *western blot* estão na forma pró-ativa (RHEE e COUSSENS, 2002; TORREZ-MARTINEZ *et al.*, 2017). Já no zimograma, as bandas observadas correspondem à forma ativa da MMP-2, que é capaz de degradar a gelatina presente no gel. Isto significa que, enquanto o *western blot* analisa as proteínas presentes na célula em um determinado momento, o zimograma analisa as proteínas produzidas e secretadas ao longo do tratamento. Isto explica porque a MMP-2 pró-ativa não foi observada no *western blot*, mas foi observada uma pequena atividade da MMP-2, uma vez que essa atividade pode ser proveniente de proteínas produzidas no início do tratamento, antes do início da ação do composto. A partir destes resultados, é possível atribuir que as alterações fenotípicas e a transição mesenquimal-epitelial observadas *in vitro* estão associados ao aumento de expressão do gene de E-caderina (*CDH1*) associado à diminuição proteica de MMP-2.

## 7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que os óleos essenciais de *Mentha villosa* e *Curcuma longa*, assim como suas moléculas majoritárias isoladas possuem um potencial antitumoral frente a uma linhagem tumoral de mama altamente invasiva (MDA-MB-231) com baixo efeito sobre as células normais. Os ensaios de migração demonstraram a inibição da migração das células tratadas com os óleos essenciais, indicando uma transição de um fenótipo mesenquimal para epitelial, tornando-as menos malignas, assim como a não interferência no fenótipo epitelial da linhagem menos invasiva (MCF7).

A avaliação de um conjunto de genes associados à transição epitélio-mesênquima demonstrou um aumento significativo de *CDH1*, molécula de adesão possivelmente responsável pelo fenótipo observado.

Os tratamentos provocaram a diminuição da atividade de gelatinase da proteína MMP-2, e esta proteína na sua forma inativa não foi detectada em células tratadas com os compostos por 48 horas. Estudos são necessários para investigar os mecanismos pós-transcricionais e pós-traducionais que possam estar envolvidos com a regulação desta proteína.

A partir destes resultados, o R-carvone e o  $\alpha$ -*phellandrene* se mostraram capazes de atuar na reversão do fenótipo mesenquimal em células tumorais de mama, podendo ser utilizados no desenvolvimento de fármacos adjuvantes no tratamento do câncer. Ainda, estudos são necessários para que se melhor compreenda os mecanismos de ação, alterações epigenéticas e efeitos *in vivo* destas moléculas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDSLAM, J.; MOUNIR, T.; HASSAN A. M.; LAHCEN A. M.; RACHIDA A. *et al.* Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. **Braz J Pharmacogn**, v. 22, p. 534–540, 2012.

ALI, S. *et al.* Insecticidal activity of turmeric (*Curcuma longa*) and garlic (*Allium sativum*) extracts against red flour beetle. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 2, n. 3, p. 201-205, 2014.

AMARAL, R. G. *et al.* Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound, rounifolone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 1100-1106. 2015.

AMIN, A.; GALI-MUHTASIB, H.; SCHNEIDER-STOCK, R. Overview of Major Classes of Plant-Derived Anticancer Drugs. **International Journal of Biomedical Science**, v. 5, n. 1, p. 1-11. 2009.

ARAÚJO, A. *Curcuma longa* – antitumoral, antioxidante, antiinflamatório, antimicrobiano. **Pharma Nostra**, vol. 73, 2015.

ARTACHO-CORDÓN, F.; RÍOS-ARRABAL, S.; LARA, P. C.; *et al.* Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. **Surgical oncology**, p. 1–9, 2012.

AYDIN, E.; TÜRKEZ, H.; KELES, M. S. Potential anticancer activity of Carvone in N2a neuroblastoma cell line. **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 8, p. 764-772. 2015.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475. 2008.

BEHURA, S. *et al.* Major constituents in leaf essential oils of *Curcuma longa* and *Curcuma aromatic*. **Current Science**, v. 86, n. 11. 2002.

BERNARDO, M. M.; FRIDMAN, R. TIMP-2 regulates MMP-2 activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. **Biochemistry Journal**, v. 374, p. 739-745.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N. *et al.* *IN vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 156-163, 2008.

BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. 1-11, 2013.

BISSELL, M.J.; RADISKY, D.C.; RIZKI, A.; WEAVER, V.M.; PETERSEN, O.W. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation; research in biological diversity**, n. 70, p. 537-546, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–54, 1976.

BRAHMI, F.; KHODIR, M.; MOHAMED, C.; PIERRE, D. Chemical composition and Biological Activities of Mentha Species. *Aromatic and Medicinal Plants – Back to Nature*. 1 ed. Cairo: Intech, 2017.

CARDENAS, H.; VIETH, E.; LEE, J.; SEGAR, M.; LIU, Y.; NEPHEW, K. P.; MATEI, D. TGF-beta induces global changes in DNA methylation during the epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. **Epigenetics**, v. 9, p. 1461–1472, 2014.

CARVALHO, C. C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, p. 413-422. 2017.

CHEN, H. W.; HUANG, H. C. Effects of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 1029-1040, 1998.

CHEN, Q. et al. Curcumin suppresses migration and invasion of human endometrial carcinoma cells. **Oncology Letters**, p.1287-1302, 2015.

CHOOKOTE, W. *et al.* Chemical composition and anti-mosquito potential of rhizome extract and volatile oil derived from *Curcuma aromatica* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J. Vector Ecol.** vol, 30, p. 302–309.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 2, p. 72-72, 2015.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Theirs Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 1, p. 308-323. 2007.

FANG *et al.* MicroRNA-29b Supresses Tumor Angiogenesis, Invasion and Metastasis by Regulating Matrix Metalloproteinase 2 Expression. **Hepatology**, v. 54, n. 5, p. 1729-1740, 2011.

FIGUEIRA, R. C., GOMES, L.R., et al. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC Cancer**, v.9, p.20. 2009.

FONTES, J. E. N.; FERRAZ, R. P. C.; BRITTO, A. C. S.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumor effect of the

essential oil of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Chemistry E Biodiversity**, v. 10, n. 13, p. 722-729, 2013.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-23, 2014.

HAJRA, K. M.; CHEN, D. Y.; FEARON, E. R. The SLUG Zinc-Finger Protein Represses E-Cadherin in Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 62, n. 6. 2002.

HALLMAN, K.; ALECK, K.; DWYER, B.; LLOYD, V.; QUIGLEY, M.; SITTO, N.; SIEBERT, A. E. The effects of turmeric (cur cumin) on tumor suppressor protein (p53) and estrogen receptor (ER $\alpha$ ) in breast cancer cells. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v. 9, p. 153-161, 2017.

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

HEINRICH, M.; BREMNER, P. Ethnobotany and Ethnopharmacy – Their Role for Anti-Cancer Drug Development. **Current Drug Targets**, v. 7, p. 239-245, 2006.

HSIEH, S.; LI, Y.; CHANG, W.; CHUNG, J.; HSIEH, L.; WU, C. Induction of Necrosis in Human Liver Tumor Cells by  $\alpha$ -Phellandrene. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 6, p. 970-979. 2014.

HSIEH, L. C.; HSIEH, S. L.; CHEN, C. T.; CHUNG, J. G. Induction of Phellandrene on Autophagy in Human Liver Tumor Cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 1, p. 1-16. 2015.

HU, C. P.; DANDAPAT A., *et al.* Blockade of hypoxia-reoxygenation-mediated collagen type I expression and MMP activity by overexpression of TGF-beta1 delivered by AAV in mouse cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 3, 2007.

HUANG, J.; BRIDGES, L. C.; WHITE, J. M. Selective Modulation of Integrin-mediated Cell Migration by Distinct ADAM Family Members. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 4982-4991, 2005.

HUTH, H. W. *et al.* Upregulation of p38 pathway accelerates proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 37, n. 4, p.2497-2505, 2017.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Estimativa 2016-2017 – Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2017.

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; CAN, H. C. B.; DEMIRCI, F. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 3953-3946. 2002.

JAIN, D. et al. Evaluation of Cytotoxicity and Anticarcinogenic Potential of *Mentha* Leaf Extracts. **International Journal of Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 225-236. 2011.

JANA, N. R. *et al.* Inhibition of Proteasomal Function by Curcumin Induces Apoptosis through Mitochondrial Pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 12, p. 11680-11685, 2004.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. **CA Cancer Journal**, v. 61, n. 2, p. 69-90., 2011.

JERÔNIMO, A. F. A.; FREITAS, A. G. Q.; WELLER, M. Fatores de risco do câncer de mama e o conhecimento sobre a doença: revisão integrativa de estudos latino-americanos. **Ciência E Saúde Coletiva**, v. 22, n. 1, p. 135-149, 2017.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KLEINER, D. E., STETLER-STEVENSON, W. G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Anal Biochem**, v. 218, n. 2, p. 325-9. 1994.

KOKKINOS, M. I.; WAFAI, R.; WONG, M. K.; NEWGREEN, D. F.; THOMPSON, E. W.; WALTHAN, M. Vimentin and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer – Observations *in vitro* and *in vivo*. **Cells Tissues Organs**, v. 185, p. 185-191, 2007.

KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.47, n.1, p.65-81, 2001.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R. L. F.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha villosa* in DOCA-salt-hypertensive rats. **Phytomedicine**, v. 9, p. 715-720. 2002.

LAKEHAL, S.; MELIANI, A.; BENMIMOUNE, S.; BENSOUMA, S. N.; BENREBIHA, F. Z.; CHAOULA, C. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba alba* Asso grown in Algeria. **Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 435-438. 2016.

LEBER, T. M., BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Anal Biochem**, v. 249, n. 1, p.24-8. 1997.

LI, Z.; TAKINO, T.; ENDO, Y.; SATO, H. Activation of MMP-9 by membrane type-1 MMP/MMP-2 axis stimulates tumor metastasis. **Cancer Sci**, v. 108, p. 347-353, 2017.

LI, L.; LI, H. Role of MicroRNA-mediated MMP regulation in the treatment and diagnosis of malignant tumors, **Cancer Biology E Biology**, v. 14, n. 9, p. 796-805, 2013.

LIN, J. J. et al. Alpha-phellandrene- induced DNA damage and affect DNA repair protein expression in WEHI-3 murine leukemia cells *in vitro*. **Environmental Toxicology**, v. 12, n. 3. 2014.

LIN, J. J. et al. Alpha-phellandrene, a Natural Active Monoterpene, Influences a Murine WEHI-3 Leukemia Model In Vivo by Enhancing Macrophage Phagocytosis and Natural Killer Cell Activity. **In Vivo**, v. 28, n. 1, p. 583-588. 2015.

LIU, C.-Y. et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 15966–83, 2015.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. v. 24, n. 4, p. 402-8. 2001.

LOU, S. et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. **Genome Biology**, v. 15. 2014.

MAHESHWARI, R. K.; SINGH, A. K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C. Multiple biologic activities of curcumin: a short review. **Life Sciences**, v. 78, n. 3, p. 2081-2087, 2006.

MANICA, G. C. M.; KLASSEN, G. *et al.* Down Regulation of ADAM33 as a Predictive Biomarker of Aggressive Breast Cancer. **Scientific Reports**, vol. 7, p. 1-13, 2017.

MANOLOVA, Y.; DENEVA, V.; ANTONOV, L. The effect of the water on the curcumin tautomerism: A quantitative approach. *Spectrochimica Acta*, v. 132A, n. 1, p. 815–820. 2014.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer letters**, v. 235, n. 1, p. 114-120, 2006.

MARCHI, J. P.; TEDESCO, L.; MELO, A. da C.; FRASSON, A. C.; FRANÇA, V. F.; SATO, S. W.; LOVATO, E. C. W. *Curcuma longa*, o açafrão-da-terra, e seus benefícios medicinais. **Arq. Cienc. Saúde**, v. 20, n. 3, p. 189-194. 2016.

MATA, A. R.; NELSON, D. L.; AFONSO, J. C. F.; GLÓRIA, M. B.; JUNQUEIRA, R. G. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas**, v. 24, n. 1, p. 151-157, 2004.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia graciis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MENDONÇA, G. A. S; SILVA, A. M.; CAULA, W. M. Características tumorais e

sobrevida em pacientes com câncer de mama admitidas no Instituto Nacional de Câncer RJ. **Cadernos de Saúde Pública RJ**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 5, p. 1232-1239, ago/set. 2004.

MORAES, M. E. A.; CUNHA, G. H.; BEZERRA, M. M.; FECHINE, F. V.; PONTES, A. V.; ANDRADE, W. S.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, P. P.; Efficacy of the *Mentha crisper* in the treatment of women with *Thichomonas vaginalis* infection. **Springer-verlag**, v. 286, p. 125-130. 2012.

MOUDI, M.; NAZRE, M. Vinca Alkaloids. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1231-1235. 2013.

MULLER, A. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 1, p. 50-56. 2001.

OLIVEIRA, E. S. **Avaliação do efeito de óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e *Mentha villosa* em linhagens de células de adenocarcinoma humano de pulmão: citotoxicidade, ciclo celular e produção de TGF- $\beta$ 1**. Tese (doutorado em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias), Universidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2015.

OLIVEIRA, F. C. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas pela comunidade assistida pela pastoral da criança em Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil**. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

ONDER, T. T. *et al.* Loss of E-cadherin Promotes Metastasis via Multiple DOWnstream Transcriptional Pathways. **Cancer Research**, v. 68, n. 10, p. 3645-3654. 2008.

PAHWA, S.; STAWIKOWSKI, M. J.; FIELDS, G. B. Monitoring and inhibiting MT1-MMP during cancer initiation and progression. **Cancers**. v. 6, 416-435, 2014.

PARVEEN, Z.; NAWAZ, S.; SHAHZAD, K. Compositions and antimicrobial activity of essential oils from leaves of *Curcuma longa*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 1, p. 117-122. 2013.

PATEL, P. B.; THAKKAR, V. R. L-Carvone Induces p53, Caspase 3 Mediated Apoptosis and Inhibits de Migration of Breast Cancer Cell Lines. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 3, p. 453-462. 2014.

PELTIER, S.; OGER, J. M.; LAGARCE, F.; COUET, W.; BENOÎT, J. P. Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, vol. 23, n. 6, p. 1243–1250. 2006.

PEREIRA, I. T. *et al.* Fibronectin Affects Transient MMP2 Gene Expression through DNA Demethylation Changes in Non-invasive Breast Cancer Cell Lines. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. 1-7. 2014.

POINCLOUX, R.; LIZÁRRAGA, F.; CHAVRIER, P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. **Journal of Cell Science**, v. 122, 3015-3024, 2013.

RAHIMIFARD, N.; HAJIMEHDIPOOR, H.; HEDAYATI, M. H.; BAGHERI, O.; PISHEVAR, H.; AJANI, Y. Cytotoxic Effects of Essential Oils and Extracts of some *Mentha* species on Vero, Hela and Hep2 Cell Lines. **Journal of Medical Plants**, v. 9, n. 35, p. 88-92. 2010.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 13, p. 107-109, 2010.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Effect of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene and perillic acid in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells. **Journal of Experimental E Clinical Research**, v. 22, n. 3, p. 419-424, 2006.

RHEE, J. S.; COUSSENS, L. M. RECKing MMP function: implications for cancer development. **Trends Cell Biol**, v. 12, n. 5, p. 209-211, 2002.

SANTOS, M. R. V.; MOREIRA, F. V.; FRAGA, B. P.; DE SOUZA, D. P.; BONJARDIM, L. R.; QUNTANS-JUNIOR, L. J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 764-771, 2011.

SATELLI, A.; LI, S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. **Celular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 15, p. 3033-3046, 2011.

SENISKI G. G. *et al.* ADAM33 gene silencing by promoter hypermethylation as a molecular marker in breast invasive lobular carcinoma. **BMC Cancer**, vol. 9, n. 80, 2009.

SERRANO-GOMEZ, S. J.; MAZIVEYI, M.; ALAHARI, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post- translational modifications. **Molecular Cancer**, p. 1–14, 2016.

SETHI, N.; KANG Y. Notch signalling in cancer progression and bone metastasis. **Br J Cancer**, v. 105, n. 12, p. 1805-10. 2011.

SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., JEMAL, A. Global Cancer Statistics. **CA Cancer Journal**, v. 67, n. 1, p. 7-30. 2017.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; FIGUEIREDO, P. M.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oils from *Casearia sylvestris* SW on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 1, 2008.

SOBRAL, M. V. et al. Antitumor Activity of Monoterpenes Found in Essential Oils. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p.1-35, 2014.

SOUSA, P. J. C. et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 42, n. 1, p. 655-659. 2009.

SOUZA, P. J. C.; LINARD C. F. B. M.; AZEVEDO-BATISTA, D.; OLIVEIRA, A. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 655-659. 2009.

TAM, W. L.; WEINBERG, R. a. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1438–49, 2013

TELES, N. S. B.; FECHINE, F. V.; VIANA, I. O. L.; NASCIMENTO, D. F. N.; LEITE, A. L. A.; MORAES, M. E. A. Evaluation of the therapeutic efficacy of *Mentha crispata* in the treatment of giardiasis. **Contemporary Clinical Trials**, v. 32, p. 809-813. 2011.

TODD, R.; WONG, D. T. Oncogenes. **Anticancer Res**, v. 19, n. 6, p. 4729-4746, 1999.

TORRES-MARTÍNEZ, A. *et al.* Claudin-6 enhances cell invasiveness through claudin-1 in AGS human adenocarcinoma gastric cancer cells. **Experimental Cell Research**, v. 350, n. 1, p. 226-235, 2017.

TRIPATHI, A. K. et al. Bioactivities of the leaf essential oil of *Curcuma longa* on three species of stored-products beetles. **Journal of Economy and Entomology**, v. 95, n. 1, p. 83-89. 2002.

VALACCA, C.; TASSONE, E.; MIGNATTI, P. TIMP-2 Interaction with MT1-MMP Activates the AKT Pathway and Protects Tumor Cells from Apoptosis. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. 1-17. 2015.

WANNES, W. A. et al. Atioxidant activities of the essential oils and metanol extracts from myrtle (*Mystus communis* L) leaf, stem and fower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. mechanisms of motility in metastasizing cells. **Mol Cancer Res**, v. 8, n. 5, p. 629-642, 2010.

YU, L.; YAN, J.; SUN, Z. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p.2339-2346, 2017.

ZAGALLI, V. F.; BERNER, C. H. Effect of Phellandrene in insects associated to corn. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 72, n. 34, p. 34-38, 2017.

ZENG, L.; KYPRIANOU, N. Apoptotic regulators in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): value in prostate cancer detection and prevention. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 8, n. 7, 2005.

ZHANG, S.; MA, J.; FU, Z. *et al.* Promotion of breast cancer cells MDA-MB-231 invasion by di(2-ethylhexyl)phthalate through matrix metalloproteinase-2/-9 overexpression. **Environmental Sciences and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9742-9749, 2016.

ZU, Y. *et al.* Activity of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. **Molecules**, v. 15, n. 1, p. 3200-3210, abr. 2010.