

Universidade Federal de Ouro Preto  
Escola de Farmácia  
Departamento de Análises Clínicas

**Análise do efeito antitumoral do óleo essencial de *Cymbopogon densiflorus* sobre células de câncer de bexiga**

Gizele Lucia da Costa Pereira  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glenda Nicioli da Silva  
Coorientadora: Ms. Tamires Cunha Almeida

Ouro Preto/ Minas Gerais – Brasil  
Dezembro/201

Gizele Lucia da Costa Pereira

**Análise do efeito antitumoral do óleo essencial de *Cymbopogon densiflorus* sobre células de câncer de bexiga**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)  
como parte das exigências do curso de Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glenda Nicioli da Silva

Coorientadora: Ms. Tamires Cunha Almeida

Ouro Preto/ Minas Gerais – Brasil

Dezembro/2018

P434a

Pereira, Gizele Lucia da Costa.

Análise do efeito antitumoral do óleo essencial de *Cymbopogon densiflorus* sobre células de câncer de bexiga [manuscrito] / Gizele Lucia da Costa Pereira. - 2018.

44f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Glenda Nicioli da Silva.  
Coorientadora: Profª. MScª. Tamires Cunha Almeida.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Bexiga- Câncer. 2. Agentes antineoplásicos. 3. Bexiga- Câncer. 4. Óleos essenciais. 5. *Cymbopogon*. I. Silva, Glenda Nicioli da. II. Almeida, Tamires Cunha. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616-006.6

Catálogo: [ficha.sisbin@ufop.edu.br](mailto:ficha.sisbin@ufop.edu.br)



ESCOLA DE FARMÁCIA



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

### TERMO DE APROVAÇÃO

#### Análise do efeito antitumoral do óleo essencial de *Cymbopogon densiflorus* sobre células de câncer de bexiga

Trabalho de Conclusão de Curso defendido por Gizele Lucia da  
Costa Pereira e aprovado com nota 30,0, em 03 de Dezembro de  
2018, pela comissão examinadora:

*Tatiane Roquete Amparo*

Doutoranda Tatiane Roquete Amparo (PPG CiPharma-EF-UFOP)

*Gustavo Henrique Bianco de Souza*

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza (DEFAR-EF-UFOP)

*Tamires Cunha Almeida*

Doutoranda Tamires Cunha Almeida (Coorientadora-PPG CiPharma-EF-UFOP)

*Glenda Nicioli da Silva*

Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva (Orientadora-DEACL-EF-UFOP)

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos

Ms. Janaina Seibert Brandão

Laboratório de Fitotecnologia - Universidade Federal de Ouro Preto

Coordenador Técnico Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares

Laboratorio Multiusuario de Citometria de Fluxo

Universidade Federal de Ouro Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanildes Vasconcelos Rodrigues.

Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Farmacêutico da Diretoria de Pesquisa e  
Desenvolvimento (DDTF/DPD) - Fundação Ezequiel Dias (FUNED)

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

A Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), agradeço pelos ensinamentos profissionalizantes que contribuem hoje para minha formação. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade através do apoio financeiro de desenvolver a pesquisa.

A todo corpo docente do curso de farmácia, em especial minha orientadora Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva e o Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos por me ajudarem durante o desenvolvimento deste trabalho, compartilhando muito dos seus conhecimentos comigo.

Agradeço também as coorientadoras Tamires Cunha Almeida e Janaina Seibert Brandão, que foram essenciais para que o projeto fosse colocado em prática. Obrigada pelos conselhos e pela paciência durante esse período.

Aos laboratórios de Pesquisa Clínica e Fitotecnologia bem como meus colegas Ana Paula Braga, Tatiane Barros e Pedro Moregola pela convivência diária, meu agradecimento.

A todos os pesquisadores colaboradores em especial Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanildes Vasconcelos Rodrigues. meus sinceros agradecimentos pela contribuição para a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Agradeço a Deus, sobretudo, por me dar a força e me capacitar pra chegar ate essa etapa da minha vida.

Aos meu pais, Marco Antonio e Marlene, pelo amor incondicional, incentivo e por todo apoio dado a mim em todo esse tempo.

Aos demais familiares e amigos pelo o companheirismo por todo esse tempo mesmo com a distancia, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

O carcinoma de bexiga é o decimo segundo câncer mais comum do mundo. O tratamento convencional envolve quimioterapia, utilizando o protocolo MVAC (metotrexato, vimblastina, doxorrubincina e cisplatina), que apresenta efeitos tóxicos por atingir não apenas as células tumorais, mas também células saudáveis. Dessa maneira, surge a necessidade de novas pesquisas em busca de compostos com potencial efeito antitumoral. O óleo essencial de *Cymbopogon densiflorus*, popularmente conhecida como “capim-santo”, apresenta diversas atividades biológicas, porém sua atividade antitumoral ainda não foi estudada. Diante disso, o objetivo do estudo foi analisar o efeito antitumoral do óleo essencial de *C. densiflorus* nas linhagens celulares RT4 e T24 de câncer de bexiga que apresentam diferente *status* do gene *TP53*. Extraiu-se o óleo por hidrodestilação e utilizou-se o método de cromatografia gasosa acoplada ao espectrometria de massas (CG-EM) para a caracterização dos compostos majoritários. Analisou-se *in silico* estes compostos e suas potenciais atividades biológicas e mecanismos de ação relacionados ao câncer. Em seguida, foi feita análise da citotoxicidade e proliferação celular após o tratamento com o óleo essencial de *C. densiflorus*, bem como análise de seu efeito na modulação do ciclo celular e no processo de apoptose. Na caracterização do óleo foram identificados cinco compostos majoritários: *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, *trans-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol, *cis*-piperitol e *cis-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol. A análise *in silico* indicou atividade antitumoral do óleo essencial *C. densiflorus* por diferentes mecanismos, sendo os principais: estimulante de caspase 8, aumento da expressão do gene *TP53*, inibição do gene *JAK2* e agonista de apoptose e inibição de *MMP9*. O óleo essencial de *C. densiflorus* apresentou efeito citotóxico e reduziu a proliferação celular de RT4 e T24. Não houve modulação no ciclo celular das linhagens RT4 e T24 após o tratamento. Na linhagem RT4, observou-se aumento das taxas de apoptose após o tratamento. Na linhagem T24 não houve aumento de apoptose nem necrose, sugerindo que outras vias de morte celular estejam ocorrendo nesta linhagem. Em conclusão, o óleo essencial de *C. densiflorus* apresenta atividade citotóxica em linhagens tumorais de bexiga, provavelmente induzindo mecanismos relacionados à apoptose em linhagens *TP53* selvagens.

**Palavras chaves:** atividade antitumoral, câncer de bexiga, *Cymbopogon densiflorus*, óleo essencial

## ABSTRACT

Bladder carcinoma is the world's twentieth most common cancer. Its conventional treatment involves chemotherapy using the MVAC protocol (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) which has many toxic effects by targeting not only tumor cells but also healthy cells. Thereby, it is need for new research in search of compounds with potential antitumor effect appears. The essential oil of *Cymbopogon densiflorus*, popularly known as "holy grass", presents several biological activities, but its antitumor activity was not studied. The aim of this study was to analyze the antitumor effect of the essential oil of *C. densiflorus* on the RT4 and T24 cell lines of bladder cancer that present different *TP53* gene status. Thus, the oil was extracted by hydrodistillation and the gas chromatography method coupled to the mass spectrometry (GC-MS) was used for the characterization of the major compounds. These compounds and their potential biological activities and mechanisms of action related to cancer were analyzed *in silico*. Then, cytotoxicity and cell proliferation were analyzed after treatment with the essential oil of *C. densiflorus*, as well as analysis of its effect on cell cycle modulation and the apoptosis process. In the characterization of the oil, five major compounds were identified: *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol, *trans-p*-mentha (7), 8-dien-2-ol, *cis*-piperitol and *cis-p*-mentha-1 (7), 8-dien-2-ol. The *in silico* analysis of these indicated the antitumor activity of the essential oil *C. densiflorus* by different mechanisms, mainly as caspase 8 stimulant, increased *TP53* gene expression, inhibition of the *JAK2* gene and as agonist of apoptosis, besides the inhibition of *MMP9*. The essential oil of *C. densiflorus* presented cytotoxic effect and reduced the cellular proliferation of RT4 and T24. There was no modulation in the cell cycle of the RT4 and T24 lines after treatment. In the RT4 line, apoptosis rates were increased after the treatment. In the T24 line there was no increase in apoptosis or necrosis, suggesting that other cell death pathways are occurring in this line. In conclusion, the essential oil of *C. densiflorus* shows cytotoxic activity in bladder tumor lines, probably inducing mechanisms related to apoptosis in wild *TP53* strains.

**Keywords:** Antitumor activity, bladder cancer, *Cymbopogon densiflorus*, essential oil

## LISTA DE ABREVIÇÕES

<b>UFOP</b>	Universidade Federal de Ouro Preto
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette Guerin
<b>MVAC</b>	Metrotexato, Vinblastina, Doxorrubicina, Cisplatina
<b>ANVISA</b>	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DMEM</b>	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
<b>MTT</b>	1-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-3,5- diphenylformazan
<b>DEBIO</b>	Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente
<b>ICEB</b>	Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
<b>CG-EM</b>	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
<b>DDTF/DPD</b>	Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Farmacêutico da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento
<b>FUNED</b>	Fundação Ezequiel Dias
<b>µL</b>	Microlitro
<b>kPa</b>	Kilopascal
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>min</b>	Minutos
<b>s</b>	Segundos
<b>IK</b>	Índice de Kovats

<b>Pa</b>	Probabilidade de ser ativo
<b>Pi</b>	Probabilidade de ser inativo
<b>µg</b>	Micrograma
<b>mL</b>	Mililitros
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>nm</b>	Nanometro
<b>g</b>	Gramas
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>CNT</b>	Controle não tratado
<b>AITC</b>	Alil isotiacianato

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Desenvolvimento do câncer	<b>Pag 15</b>
<b>Figura 2</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma	<b>Pag 16</b>
<b>Figura 3</b>	Estadiamento do câncer de bexiga	<b>Pag 17</b>
<b>Figura 4</b>	<i>Cymbopogon densiflorus</i>	<b>Pag 20</b>
<b>Figura 5</b>	Cromatograma obtido através da CG-EM do óleo essencial das folhas de <i>C. densiflorus</i> .	<b>Pag 27</b>
<b>Figura 6</b>	Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial de <i>C. densiflorus</i> identificados através da CG-EM.	<b>Pag 29</b>
<b>Figura 7</b>	Porcentagem de células viáveis das linhagens RT4 e T24 imediatamente após o tratamento com óleo essencial das folhas de <i>C. densiflorus</i> .	<b>Pag 32</b>
<b>Figura 8</b>	Porcentagem de células viáveis das linhagens RT4 e T24 24 horas após o tratamento com óleo essencial das folhas de <i>C. densiflorus</i> .	<b>Pag 32</b>
<b>Figura 9</b>	Histogramas representativos da cinética do ciclo celular em células das linhagens RT4 e T24 após o tratamento com o óleo essencial de <i>C. densiflorus</i>	<b>Pag 33</b>
<b>Figura 10</b>	Índices de apoptose e necrose nas células das linhagens RT4 e T24 após o tratamento com óleo de <i>C. densiflorus</i> .	<b>Pag 34</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Caracterização química do óleo essencial das folhas de *C. densiflorus*. **Pag 28**
- Tabela 2** Análise *in silico* do potencial efeito antitumoral do óleo essencial das folhas de *C. densiflorus* usando a ferramenta PASS online. **Pag 30**
- Tabela 3** Análise *in silico* do potencial mecanismo de ação do óleo essencial das folhas de *C. densiflorus* usando a ferramenta PASS online. **Pag 31**

## 1. Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO.....	15
3. OBJETIVO.....	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIAIS E METODOS.....	22
4.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	22
4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	22
4.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO POTENCIAL ANTITUMORAL.....	23
4.5 LINHAGENS CELULARES.....	24
4.6 CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	24
4.7 CINÉTICA DO CICLO CELULAR.....	25
4.8 APOPTOSE.....	24
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5. RESULTADOS.....	27
5.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	27
5.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	27
5.3 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO POTENCIAL ANTITUMORAL.....	30
5.4 CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	31
5.5. CINÉTICA DO CICLO CELULAR.....	33
5.6. APOPTOSE.....	33
6 DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	38
8. REFERÊNCIAS.....	39

## 1.INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda causa de morte no mundo. Cerca de 9,6 milhões de pessoas morrem por ano por causa dessa doença. Dentre os tumores, destaca-se o de bexiga por sua alta taxa de recorrência e por ser o mais comum do trato geniturinário (SANLI, O. et al, 2017; BRAY, F. et al 2018). No mundo, o câncer de bexiga é o decimo segundo mais comum (BRAY, F. et al 2018). As causas que levam ao desenvolvimento do tumor de bexiga vão além dos fatores genéticos e tem sido mencionado na literatura fatores externos como o consumo de cigarro e a exposição direta a compostos químicos (POMPEO, A. C. L. et al., 2008). Esse tumor tem um custo relevante aos sistemas de saúde devido ao tratamento e ao acompanhamento clínico e citopatológico de vigilância dos pacientes (SVÁTEK, R. S. et al., 2014). Os tratamentos protocolizados para o câncer de bexiga são cirurgias, quimioterapias e radioterapias (TEPLY, B., KIM, J. 2014). Esses, por sua vez, serão realizados dependendo do estágio do tumor. Em estágios mais avançado do tumor, a quimioterapia é o tratamento preconizado. O protocolo mais utilizado é a administração de metotrexato, vinblastina, doxorubicina e cisplatina (GROSSMAN, H. et al., 2003). No entanto, trata-se de uma terapia invasiva e com diversos efeitos colaterais, dificultando a tolerância ao tratamento pelo paciente (SAWADA, N. et al., 2009). A busca através da pesquisa de novos compostos pontencialmente antineoplásicos e que apresentem menos efeitos adversos, tem sido uma necessidade.

A prática do uso de compostos naturais, como as plantas medicinais, é milenar e é utilizada no tratamento e mesmo cura de algumas doenças (MACHADO, B.; JUNIOR, A., 2011). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil regularizou e liberou o uso de algumas plantas medicinais para esses fins (ANVISA, 2011). Os óleos essenciais, extraídos de folhas, flores, frutos e caules de plantas, tem constituição complexa, são voláteis e de baixo peso molecular, de muito interesse para a indústria farmacêutica e de perfumaria por suas atividades já conhecidas (MACHADO, B.; JUNIOR, A., 2011), tais como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antiestresse e a mais recente mencionada na literatura, antitumoral (SHARMA, P. et al 2009).

Algumas espécies do gênero *Cymbopogon* mostraram atividade antitumoral em experimentos *in vitro* e *in vivo*. (SHARMA, P. et al 2009; BAO, X. et al, 2014). Diante disso, o óleo essencial da espécie *Cymbopogon densiflorus* será avaliado em relação à sua atividade antitumoral em duas linhagens diferentes de células de tumor de bexiga.

## 2. REVISÃO

### 2.1 CÂNCER

Câncer, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018), é definido como o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos e podem espalhar-se para outras partes do corpo em um processo denominado metástase, como ilustrado pela Figura 1. Segundo dados epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2018), 9,6 milhões de mortes em 2018 são por câncer, tornando-o um sério problema de saúde pública.

Em nível mundial, estima-se que de cada seis mortes, uma esteja relacionada ao câncer (OMS, 2018).

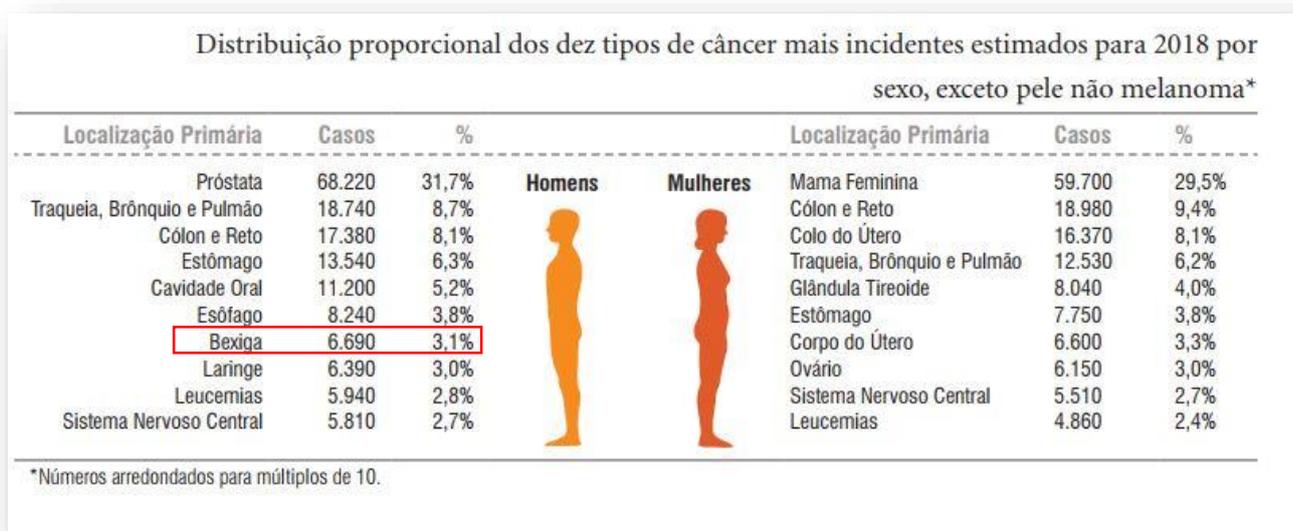


**Figura 1:** Desenvolvimento do câncer (INCA)

### 2.2 CÂNCER DE BEXIGA

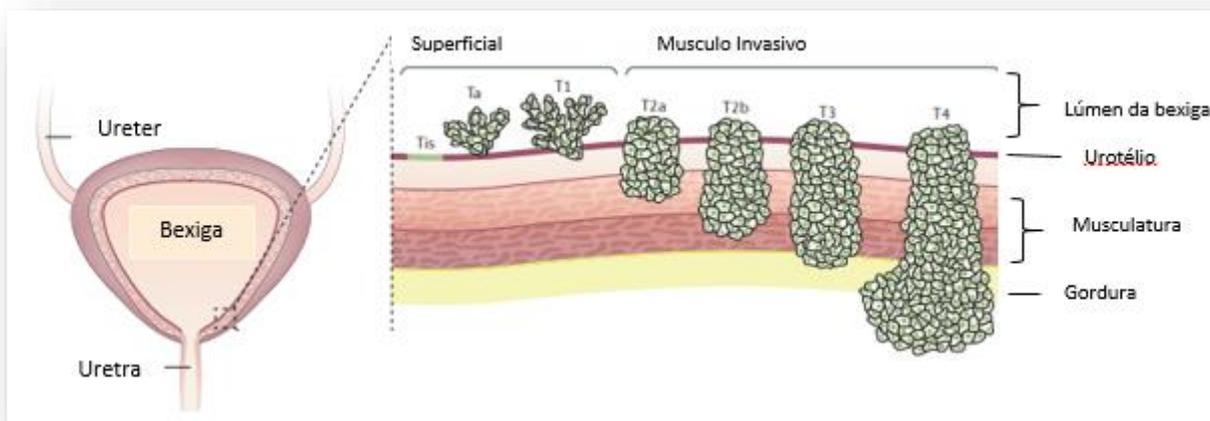
Dos diversos tipos de tumores existentes, segundo o INCA, câncer de bexiga é um dos que mais se destacam, tratando-se do tipo mais comum do trato geniturinário e o décimo segundo mais comum em escala mundial (SANLI, O. et al, 2017; BRAY, F. et al 2018). Fatores externos como o tabagismo, aumentam em três vezes o risco de desenvolvimento de câncer de bexiga. Exposição a compostos químicos orgânicos contendo aminas também contribuem para o desenvolvimento desse câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; POMPEO, A. et al., 2008). Profissionais que trabalham com solventes químicos, tinta, petróleo, como químicos, farmacêuticos, pintores, cabelereiros, tem o fator ocupacional para desenvolver carcinoma de bexiga (INCA, 2014). Em 2012, houve 430.000 novos casos e cerca de 165.000 mortes causadas por câncer de bexiga no mundo (GLOBOCAN, 2012).

Outro dado relevante em relação ao desenvolvimento de câncer de bexiga é que os homens desenvolvem mais do que as mulheres em uma razão de aproximadamente 3:1 (SANLI, O. et al, 2017). A Figura 2 apresenta dados estimados para 2018 que demonstram que o câncer de bexiga esta entre os dez câncer mais desenvolvidos em homens, no entanto, não esta entre os dez mais desenvolvidos em mulheres.



**Figura 2:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (REVISTA ONCO, 2018).

O tipo mais comum de câncer de bexiga é o carcinoma de células uroteliais, um dos tumores mais caros para os sistemas de saúde, devido às altas taxas de recorrência que exigem acompanhamento clínico e citopatológico de vigilância (SVÁTEK, R. et al., 2014). Ele pode ser superficial como na maior parte dos casos, e músculo invasivo, como ilustrado na Figura 3. A diferença entre esses dois tipos é a característica clínica que cada um apresenta (SVÁTEK, R. et al., 2014). O superficial atinge a camada interna do epitélio e não alcança as camadas mais profundas. O músculo invasivo, por sua vez, atinge as camadas mais profundas, sendo mais difícil de tratar e mais fácil de espalhar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Outras manifestações do tumor de bexiga podem ser em células escamosas, devido a irritações crônicas, infecções urinárias, ação de protozoários e como adenocarcinoma, que aparece em menor número e está também relacionado à irritação crônica do trato urinário (POMPEO, A et al., 2008).



**Figura 3:** Estadiamento do câncer de bexiga (Adaptado de Sanli et al, 2017)

Diferentes tipos de tratamento estão disponíveis para o câncer de bexiga, incluindo a ressecção transuretral para tumores superficiais, terapia intravesical usando quimioterápicos ou Bacillus Calmette Guerin (BCG) em casos recorrentes de tumor superficial e a cistectomia radical para tumores superficiais resistentes a terapia intravesical (POMPEO, A. et al., 2008). Quando o diagnóstico é feito em fase inicial, sem invasão muscular, o tratamento de escolha geralmente é local. Algum tipo de terapia intravesical é utilizada após a ressecção destes tumores superficiais, visando reduzir o risco de recorrência (TEPLY, B. KIM, J. 2014). O agente mais utilizado nesses casos é o bacilo Calmette-Guerin (BCG), que age gerando uma resposta imune contra as células tumorais residuais, mas que apresenta diversos efeitos colaterais, como febre, calafrios e a sensação de queimação na bexiga (REDELMAN-SIDI, G., GLICKMAN, M., BOCHNER, B., 2014). Para os casos mais avançados, quando há invasão muscular, o tratamento indicado é a quimioterapia sistêmica utilizando três ciclos de metotrexato, vimblastina, doxorrubicina e cisplatina, sendo este esquema conhecido como protocolo MVAC (GROSSMAN, H. et al., 2003). Entretanto, a maior parte dos quimioterápicos no mercado tem efeito tóxico nas células normais também, o que leva a efeitos colaterais tais quais supressão da medula óssea, imunossupressão, náuseas, vômitos, alopecia, toxicidade renal, cardíaca, pulmonar, neural, esterilidade, entre outras. Efeitos estes que levam, muitas vezes, a recusa do tratamento pelo paciente, por não serem bem tolerados (SAWADA, N. et al., 2009).

Dessa maneira, substâncias de origem vegetal e outros compostos naturais com potencial atividade antiproliferativa podem ser o foco do desenvolvimento de novas terapias

para o tratamento de tumores malignos (SON, Y. et al., 2003; BHATTACHARYA, A. et al., 2012; SÁVIO, A. et al., 2014).

### 2.3 PRODUTOS NATURAIS

Produtos naturais como plantas medicinais têm sido usadas pela humanidade desde os primórdios dos tempos como Medicina Chinesa, Ayurvedica e das religiões Afro-indígenas, com o objetivo de tratamento e cura (MACHADO, B.; JUNIOR, A., 2011). No Brasil, algumas plantas já são regularizadas e de uso liberado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com fins medicinais, como por exemplo Capim-cidreira, Alcachofra, Camomila e Guaco (ANVISA, 2011).

O uso de terapias alternativas oriundas de substâncias naturais na prevenção e mesmo cura de doenças tem crescido paralelamente ao progresso científico e tecnológico da medicina, despertando interesse tanto de usuários como de pesquisadores e profissionais da saúde (SPADACIO, C. et al., 2010).

Em trabalho de Newman e Cragg (2016), algumas drogas anticâncer foram descritas sendo derivadas de produtos naturais. Dentre elas, está o cloridrato de irinotecano, docetaxel, valrubicina e fosfato de etoposídeo, que foram aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA).

### 2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais, que por definição são produtos naturais com potencial atividade terapêutica e farmacológica, caracterizam-se quimicamente em mistura de substâncias voláteis e odoríferas geralmente líquidas, contidas em aparelhos secretores do vegetal, que são sintetizados durante o metabolismo secundário (MACHADO, B.; JUNIOR, A., 2011). Esse, por sua vez, está relacionado com a influência do ambiente em que a planta se encontra e com fatores como interações entre planta-microrganismo, planta-insetos e planta-planta, temperatura, luminosidade, técnica de colheita entre outros, os quais podem alterar a rota metabólica levando a formação dos mais diversos compostos (MORAIS, L. 2009).

As propriedades farmacológicas desses óleos dependem da via de administração empregada a qual pode ser cutânea, inalatória ou oral. O óleo essencial, por exemplo, ao ser ingerido pode atuar nas células devido à alteração que eles provocam na membrana citoplasmática, consequente de seu caráter lipofílico. Essa característica pode influenciar em

alguns processos vitais das células tais como transportes de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação, dentre outras reações que dependem de enzimas, alterando assim o controle quimiosmótico da célula levando-a a morte (GNATTA, J., 2016). Outras aplicações frequentes dos óleos essenciais são em nebulizações, banho de imersão e inalações justamente pela volatilidade que esses produtos apresentam. Além desta vantagem farmacológica atribuída a volatilidade e somada ao baixo peso molecular dos compostos presente no óleo, é observada a rápida eliminação destes do organismo através das vias metabólicas (MACHADO, B.; JUNIOR, A., 2011).

## 2.5 GÊNERO *CYMBOPOGON*

O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poacea, do grego kumbe (navio) e pogon (barba). Dessa família, pertence cerca de 700 gêneros e 12.000 diferentes espécies. As espécies do gênero *Cymbopogon* caracterizam-se pelo formato de suas inflorescências, cespitosas, aromáticas, tolerantes ao estresse e adaptáveis às condições climáticas e edáficas (WATSON; L. & DALLWITZ, M., 1992; SOENARKO, 1977).

Existem mais de 60 espécies de *Cymbopogon* geograficamente localizadas nas regiões tropical e subtropical da África e Ásia. São importantes para economia, por seus óleos essenciais serem matéria prima para a indústria farmacêutica e de perfumaria (SHARMA, P. et al., 2009).

A espécie *Cymbopogon flexuosus*, comum do leste Indiano, dá origem a plantas popularmente conhecidas como capim-limão. Estudos demonstram que esta, além de apresentar atividade antimicrobiana, antifúngica e antiestresse, apresenta certa citotoxicidade para células de diversas linhagens de câncer humano, sendo essa atividade observada tanto *in vitro* como *in vivo*. O mecanismo de ação elucidado é pela ativação de vias apoptóticas, tanto intrínseca quanto extrínseca, nas células estudadas (SHARMA, P. et al., 2009).

*Cymbopogon citratus* é outra espécie comum do Sri Lanka e Sul da Índia que é cultivada em outros países das regiões tropical e subtropical. Utilizada como anti-inflamatório, em tratamento para digestão e distúrbios nervosos, outra ação encontrada na literatura é sua atividade antitumoral. Em experimento *in vitro*, ela apresentou atividade imunomodulatória inibindo o crescimento de tumor Sarcoma-180 de rato (BAO, X. et al, 2014).

## 2.6 CYMBOPOGON DENSIFLORUS

A espécie *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf como apresentada na Figura 4, é conhecida popularmente como “capim-limão”, “capim-cabloco” ou “capim-santo”. Foi introduzida e naturalizada no Brasil no período colonial, apresentando folhas com característico cheiro de limão, lâminas foliares planas e glabras, com colmo ereto medindo em torno de 70 a 200 cm e pendulado devido à densa inflorescência (BARBOSA, L., 2007; WATSON; L. & DALLWITZ, M., 1992; SOENARKO, S., 1977).



**Figura 4:** *Cymbopogon densiflorus* (eastafricanplants.senckenberg.de)

Na África, esta espécie é utilizada popularmente como estimulante e adstringente. Além disso, há relatos de seu uso na medicina tradicional contra diversas doenças como reumatismo, asma, febre, resfriado, epilepsia, câimbras, cólicas, dores abdominais, tosse, bronquite, rouquidão e afecções catarrais (AKHILA, A. 2010; TAKAISI-KIKUNI, N. et al., 1996; SOENARKO, S. 1977).

Baseado no que foi descrito acima, a qual a literatura indica a importância da busca de novas terapias alternativas oriundas de produtos naturais para o tratamento de câncer e a atividade relatada de outras espécies do gênero *Cymbopogon*, este estudo se justifica no sentido de avaliar a potencial atividade antitumoral do óleo essencial da espécie *Cymbopogon densiflorus* em células de câncer de bexiga.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in silico* e *in vitro* o potencial efeito antitumoral do óleo essencial de folhas de *C. densiflorus* em células de carcinoma de bexiga.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar o óleo essencial das folhas de *C. densiflorus*.
- Analisar *in silico* os potenciais efeitos e mecanismos antitumorais dos componentes majoritários.
- Avaliar *in vitro* a citotoxicidade e proliferação das células de tumor de bexiga das linhagens T24 e RT4 após o tratamento com o óleo.
- Avaliar os efeitos do óleo sobre a cinética do ciclo celular.
- Avaliar os efeitos do óleo sobre o processo de apoptose.

## 4. MATERIAIS E METODOS

### 4.1 MATERIAIS

Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), penicilina G, streptomicina, tripsina, 1-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-3,5- diphenylformazan (MTT) e iodeto de propídeo foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA). Soro Fetal Bovino foi adquirido da Cultilab Ltda. (Campinas, Brasil). Anfotericina B foi adquirida de Cristália (Itapira, Brasil). O kit FITC AnnexinV/Dead Cell Apoptosis foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad, Estados Unidos).

### 4.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL E EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O material vegetal, folhas de *C. densiflorus*, foi coletado no bairro Bauxita na cidade de Ouro Preto-MG, Campus Morro do Cruzeiro - UFOP, onde ocorre (20°23'51"S; 43°30'40"W). A exsicata de *C. densiflorus* foi depositada no Herbário Prof. José Badini do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente (DEBIO) do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (ICEB/UFOP), sob o número OUPR 28122 e tem como registro do SisGen AC902F3. Em seguida, as folhas foram rasuradas, a fim de se reduzir o tamanho e obter uma maior superfície de contato, e pesadas. A partir da metodologia de hidrodestilação das folhas de *C. densiflorus*, por um período de aproximadamente 4 horas, obteve-se o óleo essencial, o qual foi recolhido e adicionado em um tubo de ensaio para centrifugação para separação da água. Após este processo, o óleo puro foi pesado para cálculo do rendimento.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A caracterização química do óleo essencial foi realizada através da Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (Shimadzu, modelo QP2010 com coluna capilar de sílica fundida DB-5MS com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura de filme) na Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Farmacêutico da Diretoria de Pesquisa e

Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (DDTF/DPD – FUNED) pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanildes Vasconcelos Rodrigues.

As amostras foram preparadas a partir de 20 µL de óleo essencial e 980 µL de acetato de etila e injetadas sob as seguintes condições de uso: temperatura inicial da coluna: 60°C, Split 1:50, pressão: 79,7 kPa, temperatura do injetor: 250°C; gás de arraste: Hélio; temperatura inicial do forno: 60°C, aumentando até 240°C na taxa de 3°C/min, com tempo total de análise de 60 min por uma velocidade linear de 41,6 cm/s, temperatura na fonte: 250°C, temperatura na interface: 290°C, tempo de *cut off*: 3,8 min, scan de 4-60 min e velocidade de scan de 1666 e faixa de *m/z* 20-500. O banco de dados utilizado foi o “*Wiley Mass Spectral Database*”.

O padrão utilizado foi o de hidrocarbonetos de 9 a 25 carbonos. Em seguida, foi realizado o cálculo do índice de Kovats (IK) de acordo com a fórmula abaixo:

$$IK = 100 \times \{n + (N - n)[(tr \text{ amostra} - tr \text{ n}) / (tr \text{ N} - tr \text{ n})]\}$$

Onde, IK é o índice de Kovats, n é o número de átomos de carbonos no n-alcano menor, N é o número de átomos de carbonos no n-alcano maior e tr é o tempo de retenção.

A identificação das substâncias foi realizada pela interpretação dos respectivos espectros de massa e por comparação com espectros de massa de banco de dados, com dados da literatura e pelo índice de Kovats (ADAMS, 1989).

#### 4.4 ANÁLISE *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL

Os compostos majoritários identificados por meio da CG-EM foram analisados *in silico* utilizando o programa PASS *online* (*Prediction Activity Spectra of Substances*). Os resultados das análises por PASS *online* são fornecidos como probabilidade de o composto ser ativo (Pa) e inativo (Pi) ([www.pharmaexpert.ru/passonline](http://www.pharmaexpert.ru/passonline)) (AMPARO, T. 2016). Expressos com Pa- Pi, onde Pa-Pi < 0,2: Baixo potencial; Pa-Pi < 0,5: Moderado potencial; Pa-Pi ≥ 0,5: Alto potencial.

Visando avaliar o potencial para a atividade antitumoral dos constituintes majoritários deste óleo foram analisados os resultados de Pa e Pi para os efeitos biológicos: antineoplásico, anticarcinogenico, antimetastático e antimitótico.

Também foram analisados os resultados relacionados aos mecanismos de ação dos quais inclui estimulação de caspase-8 e caspase-3, indutor da expressão de *TP53*, inibidor da expressão de *MMP9*, *JAK2*, *HIF1A* e *BRAF*, agonista de apoptose e citostático.

#### 4.5 LINHAGENS CELULARES

Células de cancer urotelial humano da linhagem RT4 e linhagem T24 foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina G, 100 U/mL streptomomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. Todas as linhagens foram mantidas a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.6 CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para o teste de citotoxicidade e a inibição da proliferação celular as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10<sup>4</sup> e 1,5×10<sup>4</sup> células/poço para T24 e RT4, respectivamente) e, após 24 horas de incubação, foram tratadas com diferentes concentrações a partir da diluição seriada 1:2 a fim de obter as concentrações de 10 a 0,005 µL/mL do óleo de *C. densiflorus* por 24 horas. Células não tratadas e células tratadas com 20% de DMSO foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks, foram adicionados 100 µL do meio DMEM sem vermelho de fenol e 50 µL do reagente de viabilidade celular MTT (2 mg/mL). A placa foi novamente acondicionada em estufa ao abrigo de luz por mais 4 horas. Após esse período foi adicionado 60 µL do reagente dodecilsulfato de sódio (SDS) 10% 0,01 M HCl, responsável por solubilizar os cristais formados e depois de 18 horas mantida nas mesmas condições anteriores foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Para análise da proliferação celular após 24 horas, o tratamento foi removido, as células foram lavadas com Hanks e meio novo foi adicionado. Depois de mais 24 horas, outra leitura da viabilidade da células foi realizada nas mesmas condições que a do teste de citotoxicidade. Os resultados foram expressos pela porcentagem de viabilidade celular a partir da equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = (A_1 \times 100)/A_0$$

Onde,  $A_0$  representa a absorvância do controle negativo e  $A_1$  representa a absorvância da amostra.

#### 4.7 CINÉTICA DO CICLO CELULAR

$2 \times 10^5$  células de câncer de bexiga RT4 e T24 foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 horas de incubação em estufa, as células foram tratadas com diferentes concentrações 0, 0,039; 0,019; 0,009 e 0,005  $\mu\text{L}/\text{mL}$  do óleo de *C. densiflorus* por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks, removidas utilizando tripsina, ressuspensas em meio fresco e centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 200  $\mu\text{L}$  de solução de marcação (0,0914 g de cloreto de magnésio; 0,0774 g de citrato de sódio; 0,04766 g de HEPES; 10  $\mu\text{L}$  de Triton-X, 0,5 mL de iodeto de propídeo, 9,490 mL de água, adaptado de GALBRAITH et al., 1983) colocado em gelo e protegido da luz durante pelo menos 30 minutos. A percentagem de células nas fases G0/G1, S e G2/M foram medidas utilizando citômetro de fluxo BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram analisados utilizando o software FlowJo V10. Foram analisados 30.000 eventos e as análises conduzidas em triplicata.

#### 4.8 APOPTOSE

As taxas de apoptose foram avaliadas utilizando o kit FITC AnnexinV/Dead Cell Apoptosis (Invitrogen). Plaqueou-se  $2 \times 10^5$  células em placas de 12 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon densiflorus* (0,039; 0,019; 0,009 e 0,005  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) por 24 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com solução de Hanks, removidas utilizando tripsina e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, foi feita a marcação com iodeto de propídeo e anexina V seguindo o indicado pelo protocolo do kit. A percentagem de células não marcadas ou marcadas por iodeto de propídeo e/ou anexina V foi medida utilizando citômetro de fluxo (BD FACSCalibur) e posteriormente analisadas utilizando o software FlowJo V10. Foram analisados 50.000 eventos e as análises conduzidas em triplicata.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software GraphPad Prism 6 foi utilizado nas análises estatísticas dos resultados. Como os dados apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .



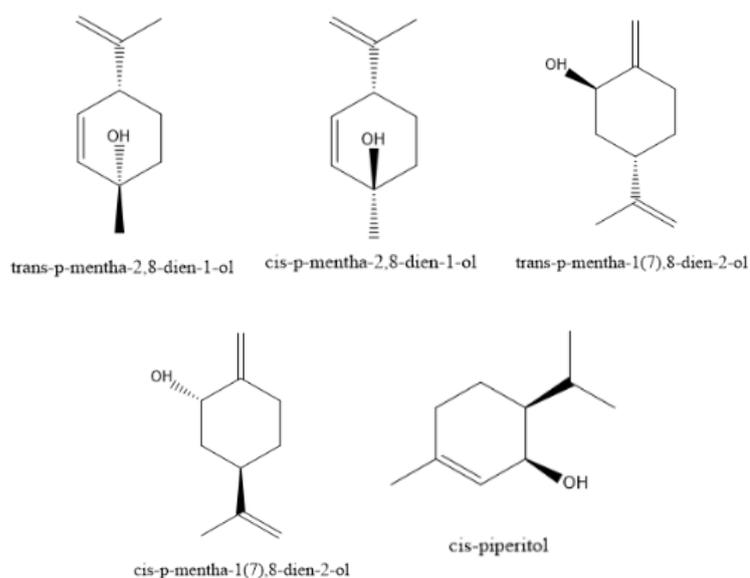
**Tabela 1:** Caracterização química do óleo essencial das folhas de *C. densiflorus*.

Pico	Tr (min)	IK calculado	IK real	Composto	Classe	Porcentagem (%)
1	5,075	927,3	-	-	-	0,04
2	7,160	1005,9	1008	<iso> Silvestreno	Monoterpeno Hidrocarbonico	0,07
3	7,769	1023,3	1017	< alfa-> Terpineno	Monoterpeno Hidrocarbonico	0,71
4	7,929	1027,9	1029	Limoneno	Monoterpeno Hidrocarbonico	0,36
5	9,045	1059,6	-	-	-	0,03
6	9,384	1069,4	-	-	-	0,10
7	10,129	1090,4	1091	<p-> Cimeneno	Monoterpeno Hidrocarbonico	0,30
8	10,345	1096,6	-	-	-	0,07
9	11,051	1114,3	-	-	-	0,05
<b>10</b>	<b>11,358</b>	<b>1121,8</b>	<b>1122</b>	<b>&lt;trans-p-&gt;Menta-2,8-dien-1-ol</b>	<b>Monoterpeno oxigenado</b>	<b>12,91</b>
11	11,455	1124,1	1136	<cis-> (Me vs IPP) Oxido limoneno	Monoterpeno Oxigenado	0,06
<b>12</b>	<b>11,936</b>	<b>1135,9</b>	<b>1137</b>	<b>&lt;cis-p-&gt;Menta-2,8-dien-1-ol</b>	<b>Monoterpeno Oxigenado</b>	<b>9,49</b>
13	12,176	1141,7	1144	<cis-beta->Terpineol	Monoterpeno Oxigenado	0,03
14	12,491	1149,3	1159	Karahanaenone	Monoterpeno Oxigenado	0,15
15	12,708	1154,6	-	-	-	0,46
16	13,218	1167,1	1160	<5-> Pentil ciclohexa-1,3-dieno	Monoterpeno Hidrocarbonico	0,71
17	13,800	1181,3	-	-	-	0,05
<b>18</b>	<b>14,067</b>	<b>1187,8</b>	<b>1189</b>	<b>&lt;trans-p-&gt; Menta-1(7),8-dien-2-ol</b>	<b>Monoterpeno Oxigenado</b>	<b>18,38</b>
19	14,290	1193,2	-	-	-	0,04
20	14,473	1197,7	1200	<trans-> Dihidro carvona	Monoterpeno Oxigenado	0,78
<b>21</b>	<b>14,575</b>	<b>1200,2</b>	<b>1196</b>	<b>&lt;cis-&gt; Piperitol</b>	<b>Monoterpeno Oxigenado</b>	<b>12,42</b>
22	14,736	1204	1200	<trans-> Dihidro carvona	Monoterpeno Oxigenado	0,26
23	14,848	1026,5	1200	<cis-4-> Caranona	Monoterpeno Oxigenado	5,75
24	14,925	1208,3	-	-	-	0,76
25	15,092	1212	-	-	-	0,83
26	15,304	1217	1208	<trans-> Piperitol	Monoterpeno Oxigenado	3,86
27	15,366	1219	-	-	-	2,22
28	15,515	1222	-	-	-	0,01
29	15,666	1225	-	-	-	0,18
<b>30</b>	<b>15,835</b>	<b>1229</b>	<b>1230</b>	<b>&lt;cis-p-&gt; Menta-1(7),8-dien-2-ol</b>	<b>Monoterpeno Oxigenado</b>	<b>16,85</b>

31	15,936	1232	1229	<cis-> Carveol	Monoterpeno Oxigenado	0,55
32	16,415	1243	1243	Carvona	Monoterpeno Oxigenado	4,99
33	16,726	1250	-	-	-	0,43
34	17,501	1268	-	-	-	0,08
35	17,545	1269	-	-	-	0,01
36	17,771	1274	1271	Perilla aldeído	Monoterpeno Oxigenado	0,65
37	18,280	1286	-	-	-	0,30
38	18,515	1292	1289	<2- pentil-> Ciclopent-2-en-1-ona	Monoterpeno Oxigenado	0,20
39	18,985	1302	-	-	-	0,04
40	24,711	1438	-	-	-	0,11
41	25,048	1447	1445	Isoamil octanato	Sesquiterpeno Oxigenado	0,66
42	32,648	1639,6	1642	Fenil etil hexanoato	Sesquiterpeno Oxigenado	0,22
43	39,714	1836,1	-	-	-	0,15
44	49,925	2129	-	-	-	2,51
45	50,170	2137	-	-	-	0,31
46	50,654	2153	-	-	-	0,09
47	52,740	2224	-	-	-	0,78
Total						100%

\*Tr: tempo de retenção; IK calculado: Índice de Kovatis calculado; IK real: Índice de Kovatis real.

Na Figura 6 são apresentadas as estruturas dos compostos majoritários do óleo essencial de *C. densiflorus*.



**Figura 6:** Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial de *C. densiflorus* identificados através da CG-EM.

### 5.3 ANÁLISE *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL

Os compostos majoritários identificados pelo método de CG-EM foram analisados *in silico* utilizando o programa PASS Online (*Prediction Activity Spectra of Substances*). Os resultados foram expressos pela diferença entre Pa (probabilidade do composto ser ativo) – Pi (probabilidade do composto ser inativo) e foram classificados como:  $(Pa - Pi) < 0,2$ : baixo potencial;  $0,2 \leq (Pa - Pi) < 0,5$ : moderado potencial;  $(Pa - Pi) \geq 0,5$ : alto potencial. Nas Tabelas 2 e 3 observamos a classificação (baixo, moderado e alto) das atividades biológicas e dos potenciais mecanismos de ação, respectivamente, dos compostos majoritários do óleo essencial de *C. densiflorus*.

Em relação as atividades biológicas, a análise *in silico* mostrou alto potencial para os efeitos antineoplásico para os compostos de A, B, C e D, anticarcinogênico para os compostos C e D, e antimetastático para os compostos C, D e E. O efeito antimitótico por sua vez apresentou um potencial moderado para os compostos C e D, mas baixo para o composto E.

**Tabela 2:** Análise *in silico* do potencial efeito antitumoral do óleo essencial das folhas de *C. densiflorus* usando a ferramenta PASS online.

Potencial atividade biológica	Constituintes de <i>C. densiflorus</i> *				
	A	B	C	D	E
Antineoplásico	0,722	0,722	0,916	0,916	-
Anticarcinogênico	-	-	0,531	0,531	-
Antimetastático	-	-	0,590	0,590	0,551
Antimitótico	-	-	0,26	0,26	0,086

\*Valores de diferença Pa-Pi:  $Pa - Pi < 0,2$ : Baixo potencial;  $Pa - Pi < 0,5$ : Moderado potencial;  $Pa - Pi \geq 0,5$ : Alto potencial. (A) *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol; (B) *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol; (C) *trans-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol; (D) *cis-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol e (E) *cis*-piperitol. (-) Não indicou ou insatisfatória.

Em relação aos mecanismos de ação com alto potencial tem-se estimulação da caspase 8 para os compostos A, B, C e D, inibição da expressão de MMP9 para os compostos A, B, C, D e E, potencialização da expressão do gene *TP53* para os compostos C e D, inibição da expressão de JAK2 para o composto E e agonista de apoptose para os compostos C e D.

Mecanismos de ação que apresentaram moderado potencial na análise *in silico* são potencialização do gene *TP53* para os compostos A, B e E, inibição da expressão de JAK2 para os compostos A, B, C e D, agonista de apoptose para os compostos A, B e E, e inibição de

expressão de BRAF para os compostos A e B. O composto E apresentou moderado potencial para os mecanismos de estimulação de caspase 8 e citostático. Todos os compostos majoritários apresentaram moderado potencial para inibição da caspase 3 e inibição do gene *HIF1A*.

De todos os mecanismos de ação apresentados, apenas o efeito como citostático apresentou baixo potencial para os compostos A, B, C e D.

**Tabela 3:** Análise *in silico* do potencial mecanismo de ação do óleo essencial das folhas de *C. densiflorus* usando a ferramenta PASS online.

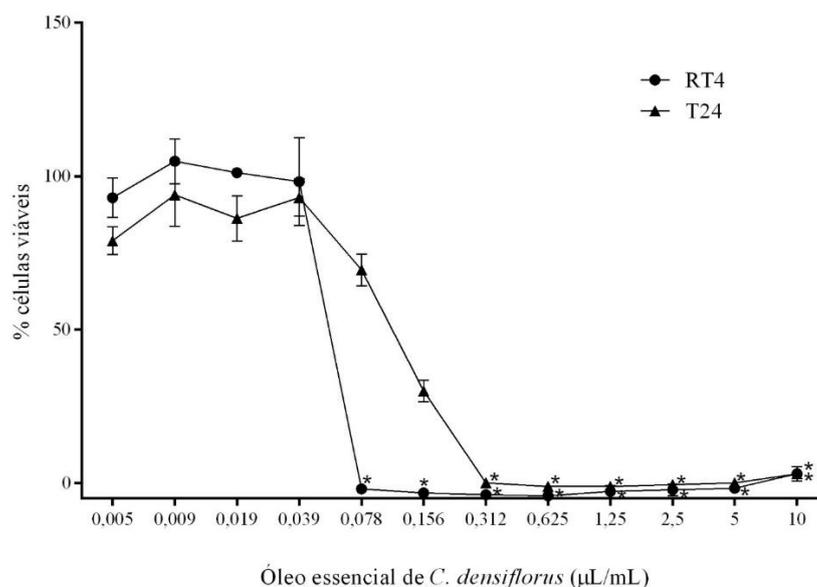
Potencial mecanismo de ação	Constituintes de <i>C. densiflorus</i> *				
	A	B	C	D	E
Estimulante de Caspase 8	0,562	0,562	0,589	0,589	0,328
Inibidor da expressão de <i>MMP9</i>	0,545	0,545	0,554	0,554	0,543
Potencializador da expressão de <i>TP53</i>	0,446	0,446	0,571	0,571	0,480
Inibidor da expressão <i>HIF1A</i>	0,385	0,385	0,252	0,252	0,468
Estimulante de Caspase 3	0,334	0,334	0,375	0,375	0,328
Inibidor da expressão de <i>JAK2</i>	0,303	0,303	0,377	0,377	0,560
Agonista de apoptose	0,296	0,296	0,695	0,695	0,416
Inibidor de expressão de <i>BRAF</i>	0,222	0,222	-	-	-
Citostático	0,164	0,164	0,180	0,180	0,280

\*Valores de diferença Pa-Pi: Pa-Pi < 0,2: Baixo potencial; Pa-Pi < 0,5: Moderado potencial; Pa-Pi ≥ 0,5: Alto potencial. (A) *trans-p*-mentha-2,8-dien-1-ol; (B) *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol; (C) *trans-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol; (D) *cis-p*-mentha-1(7),8-dien-2-ol e (E) *cis*-piperitol. (-) Não indicou ou insatisfatória.

#### 5.4 CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

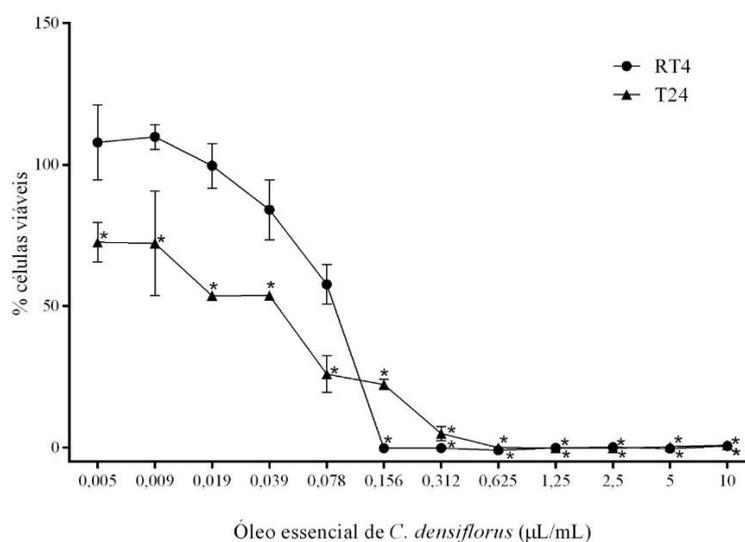
Considerando os potenciais achados da análise *in silico* seguiu-se com a análise da citotoxicidade e inibição da proliferação celular em células de câncer de bexiga das linhagens RT4 e T24.

A redução da viabilidade celular na linhagem T24 foi significativa a partir da concentração de 0,312 µL/mL e para a linhagem RT4 foi significativa a partir de 0,078 µL/mL como pode ser observado na Figura 7. Os valores de IC<sub>50</sub> encontrados para cada linhagem no teste de citotoxicidade foram de 0,135 µL/mL para T24 e de 0,052 µL/mL para RT4.



**Figura 7:** Porcentagem de células viáveis das linhagens RT4 e T24 imediatamente após o tratamento com óleo essencial das folhas de *C. densiflorus*. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos. \*  $p < 0,05$  diferença estatística em relação ao controle não tratado (CNT).

Os resultados do experimento de proliferação celular são mostrados na Figura 8. Os valores de  $IC_{50}$  foram de  $0,039 \mu\text{L/mL}$  para a linhagem T24 e  $0,088 \mu\text{L/mL}$  para linhagem RT4.

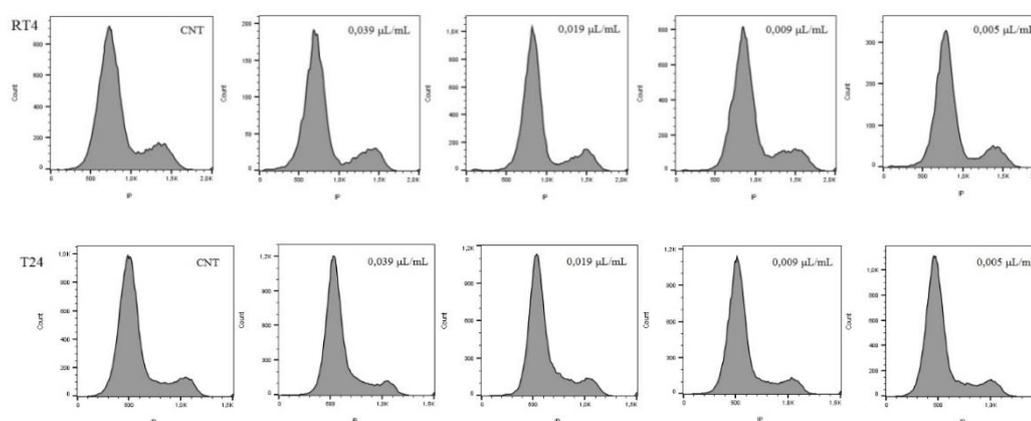


**Figura 8:** Porcentagem de células viáveis das linhagens RT4 e T24 24 horas após o tratamento com óleo essencial das folhas de *C. densiflorus*. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos. \*  $p < 0,05$  diferença estatística em relação ao controle não tratado (CNT).

## 5.5. CINÉTICA DO CICLO CELULAR

Após os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade e proliferação celular com o óleo essencial de *C. densiflorus*, a análise da modulação da cinética do ciclo celular foi realizada para correlacionar com os achados *in silico*.

Os resultados da análise da cinética do ciclo celular das linhagens RT4 e T24 após o tratamento com o óleo essencial de *C. densiflorus* são apresentados na Figura 9. Pode-se observar que o tratamento não levou a modulação do ciclo celular em nenhuma das linhagens celulares estudadas.

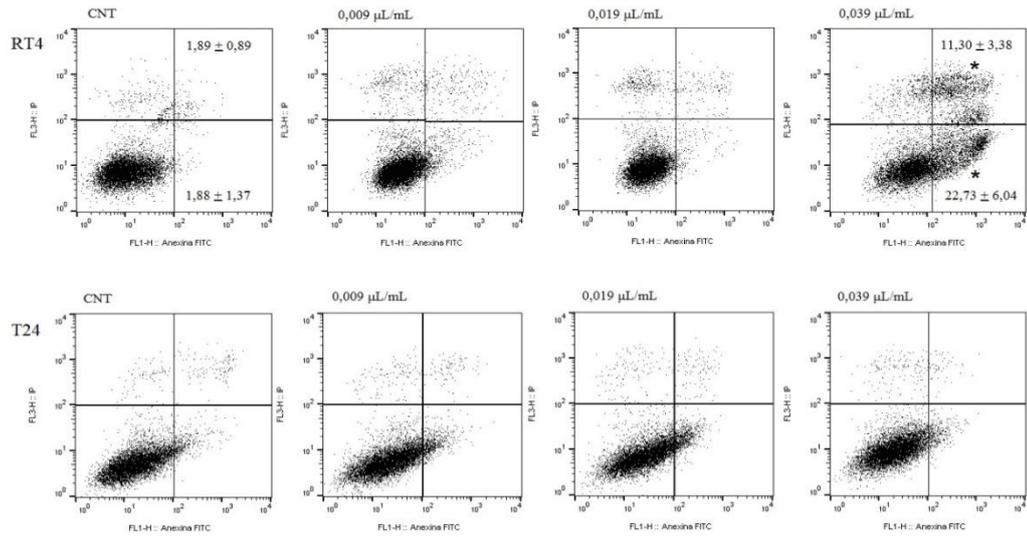


**Figura 9:** Histogramas representativos da cinética do ciclo celular em células das linhagens RT4 e T24 após o tratamento com o óleo essencial de *C. densiflorus*

## 5.6. APOPTOSE

Seguiu-se as análises laboratoriais avaliando o processo de apoptose celular das linhagens RT4 e T24 após o tratamento com o óleo essencial de *C. densiflorus*, analisando os achados *in silico* envolvendo mecanismos de apoptose celular.

O processo de morte celular das duas linhagens de células de câncer de bexiga estudadas (RT4 e T24) são apresentados na Figura 10. Para a linhagem RT4, observou-se um aumento significativo do número de células em apoptose precoce e tardia após o tratamento com a maior concentração do óleo de *C. densiflorus* (0,039 µL/mL). Na linhagem T24 não foi observado nenhum aumento significativo das taxas de apoptose e ou necrose.



**Figura 10:** Índices de apoptose e necrose nas células das linhagens RT4 e T24 após o tratamento com óleo de *C. densiflorus*. \*  $p < 0,05$  diferença estatística em relação ao controle não tratado (CNT).

## 6. DISCUSSÃO

O rendimento da extração dos óleos essenciais tem grande relação com a sazonalidade, sendo o tempo e o local do plantio grandes interferentes da sua produção (SEIBERT, J., 2015). O óleo essencial extraído das folhas de *Cymbopogon densiflorus* apresentou um rendimento que está de acordo com o trabalho de Seibert (2015), o qual demonstrou resultado semelhante, com material coletado no mesmo período do ano.

Óleos essenciais extraídos de folhas, cascas e raízes tem como principais constituintes químicos substâncias classificadas como monoterpenos e sesquiterpenos (MACHADO, B.; JUNIOR, A., 2011). Isto corrobora com a caracterização química do óleo de *Cymbopogon densiflorus*, que apresentou grande porcentagem de compostos monoterpenos (88,77%). Desta classificação fazem parte os cinco compostos majoritários. Os monoterpenos estão associados aos efeitos farmacológicos dos óleos essenciais (MACHADO, B.; JUNIOR, A., 2011), tais como atividades antibacteriana, antifúngica, anticâncer, pesticida, repelente, anti-inflamatória, analgésica e hipoglicêmica (AKHILA, A. 2010).

A possível atividade antitumoral do óleo essencial analisada *in silico* para os compostos majoritários está de acordo com os resultados do teste de citotoxicidade e proliferação celular. Além disso, pode-se perceber que o IC<sub>50</sub> obtido no experimento de citotoxicidade na linhagem RT4 foi menor, mostrando assim que ela foi mais sensível ao tratamento com o óleo de *C. densiflorus* que a linhagem T24. Resultado semelhante foi apresentado no estudo de Da Silva e colaboradores (2010), quando células da linhagem RT4 apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com cisplatina e gemcitabina do que as células T24. Isso pode ser justificado pelo diferente *status* do gene *TP53* em cada linhagem celular. O fato das células T24 possuírem esse gene mutado faz delas mais resistentes a tratamentos antitumorais (FENG, L. et al., 2000; HOFSETH, L. 2004). Além de atuar na apoptose, ele possui outros papéis relevantes nas células tumorais dentre os quais estão a parada do ciclo celular, senescência permanente e inibição da proliferação celular (DA SILVA, G. et al. 2010).

Em relação a proliferação celular, notou-se que os valores de IC<sub>50</sub> para a linhagem T24 são menores que aqueles encontrados para o experimento de citotoxicidade. Isso quer dizer que após 24 horas do fim do tratamento mais danos são detectados nessa linhagem, sugerindo que o óleo de *C. densiflorus* pode causar um dano no potencial reprodutivo das células. Para a linhagem RT4 pode-se perceber que o óleo também reduz sua proliferação. Esses resultados são corroborados por achados na literatura como no estudo de Sávio e colaboradores (2015)

em que após tratamento com alil isotiocianato (AITC) houve inibição da proliferação celular das duas linhagens celulares em 45 horas e 69 horas após o fim do tratamento. Vários processos relacionados a apoptose foram identificados na análise *in silico* como potenciais mecanismos de ação dos compostos majoritários do óleo essencial de *C. densiflorus*. Sendo eles: estimulação de caspase 8, estimulação de caspase 3 e inibidor de *JAK2*.

As caspases, em geral, são contribuidoras fisiológicas para o processo de apoptose e podem ser ativadas por dois caminhos diferentes, intrínseco e extrínseco, que em ambos ativam as proteólises e levam a danos do DNA. A caspase 8 é classificada como iniciadora enquanto que a caspase 3 é classificada como efetora (KOZLOWSKA, A. et al. 2018).

Janus quinase (JAKs) são proteínas intracelulares não receptoras de tirosina quinase que se ligam seletivamente a várias citocinas receptoras. *JAK2* é um mediador intracelular de sinalização de citocinas e hormônios encontrado em muitos tumores. Trata-se de um oncogene que impede o processo de apoptose (WANG, X. et al. 2015), sendo interessante sua inibição.

Um aumento das taxas de apoptose foi encontrada na linhagem RT4 e, como observado nos achados *in silico*, diversos mecanismos de ação pode estar relacionado a este processo. A possível potencialização da expressão de *TP53*, por exemplo, pode ter contribuído com essa via de morte celular.

Para a linhagem celular T24 não foram observadas taxas de apoptose e necrose, sugerindo que outras vias de morte celular possam estar ativas para essa linhagem. Sávio e colaboradores (2014) obtiveram resultado semelhante ao tratar células RT4 e T24 com óleo essencial de mostarda.

A regulação do ciclo celular é um importante mecanismo para assegurar a modulação e manutenção da funcionalidade celular (JUNQUEIRA, L. & CARNEIRO, J., 2012). Várias fases fazem parte do seu processo, sendo elas G0, G1, S, G2 e M. A fase G0 consiste de um período de quiescência celular. G1 é a fase a qual ocorre síntese de RNA e proteínas, bem como a fase do primeiro ponto de checagem da célula, podendo esta entrar no período de quiescência ou seguir com as outras fases do ciclo, sendo a próxima S, a fase de síntese de DNA propriamente dita, seguida por G2 onde ocorre síntese de proteínas e crescimento celular. É também um segundo ponto de reparo celular do ciclo que induz uma parada temporária caso haja dano no DNA. Esta fase termina quando se inicia a fase M, na qual ocorre a divisão celular. (JUNQUEIRA, L. & CARNEIRO, J., 2012). Embora o controle do ciclo celular seja um importante estratégia antitumoral, foi demonstrado que o óleo essencial de *C. densiflorus* não modula o ciclo celular de ambas linhagens celulares estudadas. Na análise *in silico*, portanto, foi observado que os compostos majoritários possuem baixa atividade como citostático para

todos os compostos majoritários e baixa atividade como antimitótico apenas para o composto E, ausente atividade no composto A e B, e moderado potencial para C e D.

Outros potenciais mecanismos de ação apontados na análise *in silico* se correlacionam com a atividade biológica antimetastática. Dentre as proteínas envolvidas com essa atividade está uma metaloproteinases da matriz, codificada pelo gene *MMP9*, que comumente é secretado por células tumorais e está relacionado ao processo de metástase de cânceres como esofágico, de laringe e das células escamosas orais, atuando na decomposição da matriz extracelular (ZHANG, W. et al, 2015). A inibição da expressão do gene *HIF1A* também interfere na atividade antimetastática. O fator 1-alfa induzível por hipóxia (*HIF1A*) é um fator de transcrição relacionado a adaptação da célula em um processo de hipóxia. De acordo com a literatura esse gene encontra-se com alta expressão em tumores malignos (XU, J. et al, 2014). Também foi selecionada como potencial mecanismo de ação a inibição da expressão do gene *BRAF*. O *BRAF* está muito associado a mutações de melanoma, bem como em outros cânceres, aumentando a resistência ao tratamento (HOLDERFIELD, M. et al. 2014). Como os outros genes citados previamente, leva a processo metastático. Para confirmar esses achados *in silico* relacionados a atividade antimetastática, outros testes serão necessários no futuro.

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se com o desenvolvimento deste projeto que o óleo essencial de *Cymbopogon densiflorus*:

- Foi citotóxico para as duas linhagens celulares, RT4 e T24.
- Diminuiu a proliferação celular de ambas as linhagens.
- Induziu apoptose na linhagem *TP53* selvagem após o tratamento com o óleo essencial de *C. densiflorus*.
- Não interferiu na cinética do ciclo celular nas linhagens de células de câncer de bexiga.

Dessa maneira, o óleo essencial de *C. densiflorus* apresenta atividade citotóxica em linhagens tumorais de bexiga, provavelmente induzindo mecanismos relacionados à apoptose em linhagens *TP53* selvagens.

## 8.REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oils ion trap mass spectroscopy. San Diego: Academic Press Inc., 1989.
- AKHILA, A. Essential oil-bearing grasses: The genus *Cymbopogon*. Medicinal and aromatic plants - industrial profiles, vol. 46, 2010.
- AMPARO, T. R. Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protiumspruceanum* (Benth.) Engler. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.
- BAO, Xiao Li; YUAN Hui-Hui; WANG Cheng Zhong; FAN Wei; LAN Min-Bo. Polysacchrides from *Cymbopogon citratus* with antitumor and immunomodulatory activity. *Pharmaceutical Biology* vol. 53 – Pages 117- 124. 2015
- BARBOSA, L. C. S. Morfo-anatomia e fitoquímica de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf e *Cymbopogonnardus* (L.) Rendle (Poaceae: Panicoideae). Universidade Federal de Góias, 2007.
- BHATTACHARYA, A.; LI, Y.; GENG, F.; MUNDAY, R.; ZHANG, Y. The principal urinary metabolite of allylthiocyanate, N-acetyl-S-(N-llylthiocarbamoyl) cysteine, inhibits the growth and muscle invasion of bladder cancer. *Carcinogenesis*, vol. 33, pages 394-398, 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2011. 126 paginas.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R.L., TORRE, L.A., JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 0:1- 31. 2018
- DA SILVA, G. N.; MARCONDES, J. P. C.; CAMARGO, E. A.; SAKAMOTO-HOJO E. T.; PASSOS, G. A.; SALVADORI, D. M. F Cell cycle arrest and apoptosis in TP53 subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with cisplatin and gemcitabine, *Experimental Biology and Medicine*, 235, 814–824, 2010.

DE OLIVEIRA D. T., SÁVIO A. L. V., DE CASTRO MARCONDES J. P., BARROS T. M., BARBOSA L. C., SALVADORI D. M. F. AND DA SILVA G. N. 2017 Cytotoxic and toxicogenomic effects of silibinin in bladder cancer cells with different TP53 status. *Journal Bioscience*. vol 42 pages 91–101

FENG, L.; ACHANTA, G.; PELICANO, H.; ZHANG, W.; PLUNKETT, W.; HUANG, P. Role of p53 in cellular response to anticancer nucleoside analog-induced DNA damage, *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 5, pages 597–604, 2000.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. GLOBOCAN 2012, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide International Agency for Research on Cancer*; 2013.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS, K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P.; FIROOZABADY, E. Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. *American Association for the Advancement of Science*, v.220, p.1049-1051, 1983.

GNATTA, J.R., KUREBAYASHI, L.F.S, TURRINI, R.N.T., SILVA, M.J.P. Aromatherapy and nursing: historical and theoretical conception. *Revista Escola de Enfermagem USP*. 2016;50(1): pages 127-33.

GROSSMAN, H. B.; NATALE, R. B.; TANGEN, C. M.; SPEIGHTS, V. O.; VOGELZANG, N. J.; TRUMP, D. L.; DEVERE WHITE, R. W.; SAROSDY, M. F.; WOOD DP, J. R.; RAGHAVAN, D.; CRAWFORD, E. D. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *New England Journal of Medicine*, vol. 349, pages 859–66, 2003.

HILL, R.; RABB, M.; MADUREIRA, P. A.; CLEMENTS, D.; GUJAR, S. A.; WAISMAN, D. M.; GIANCOMANTONIO, C. A.; LEE, P. W. K. Gemcitabine-mediated tumour regression and p53-dependent gene expression: implications for colon and pancreatic cancer therapy. *Cell Death & Disease*, vol. 4, page 791, 2013.

HOFSETH, L. J.; HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. p53: 25 years after its discovery, *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 25, pages 77–81, 2004.

HOLDERFIELD, M.; DEUKER, M.; McCORMICK, F.; McMAHON, M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer*. 14(7): 455–467, 2014.

INCA, 2014. Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro. 124 paginas.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Sobre o cancer, 2018.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, 376p. ISBN-10:85-277-2078-7

KOZLOWSKA, A.; KOZERA, P.; MAJEWSKI, M.; GODLEWSKI, J. Co-expression of caspase-3 or caspase-8 with galanin in the human stomach section affected by carcinoma. *Apoptosis*. 2018 Oct;23(9-10):484-491.

MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos Essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cadernos Acadêmicos*, vol. 2, pages 105-127, 2011.

MORAIS L.A.S., 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira* vol. 27: S4050- S4063.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal Natural Products*. Vol. 79(3): pages629-61, 2016.

REDELMAN-SIDI, G.; GLICKMAN, M. S.; BOCHNER, B. H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer - A current perspective. *Nature Reviews Urology*, vol. 11, pages 153–162, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE (OMS) DADOS CANCER 2018.

POMPEO, A.C.L; CARRETE, F.B.; GLINA, S.; Ortiz, V.; FERREIRA, U.; FONSECA, C.E.C. Câncer de bexiga : Diagnóstico. *Sociedade Brasileira de Urologia e Sociedade Brasileira de Patologia*. *Revista da Associação Medica Brasileira* 2008; vol. 54(2): pages 95-104.

SALEM, S. D.; ABOU-TARBOUSH, F. M.; SAEED, N. M.; AL-QADASI, W. D.; FARAH, M. A.; AL-BUHAIRI, M.; AL-HARBI, N.; ALHAZZA, I.; ALSBEIH, G. Involvement of p53 in gemcitabine mediated cytotoxicity and radiosensitivity in breast cancer cell lines. *Gene*, vol. 498, pages 300–307, 2012.

SANLI, O.; DOBRUCH, J.; KNOWLES, M.; BURGER, M.; ALEMOZAFFAR, M.; NIELSEN, M.; LOTAN, Y. Bladder Cancer. *Nature Reviews- Disease Primers*. Vol.3, 17022. 2017.

SÁVIO, A. L. V.; SILVA, G. N. ; CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M. F. Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate. *Mutation Research*, vol. 762, pages 40–46, 2014.

SÁVIO, A. L. V.; SILVA, G. N. ; SALVADORI, D. M. F. Inhibition of bladder cancer cell proliferation by allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 771, pages 29- 35, 2015.

SAWADA, NO; NICOLUSSI AC; OKINO L; CARDOZO FMC; ZAGO MMF. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. *Revista Escola de Enfermagem USP* 2009; vol. 43(3): pages 581-7.

SEIBERT, J. B. Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogondensiflorus*(Steud.) Stapf.: avaliação da sazonalidade e atividades biológicas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

SHARMA, P. R.; MONDHE D. M.; MUTHIAH S.; PAL H. C.; SHAHI A. K.; SAXENA A. K.; QAZI G. J. Anticancer activity of essential oil from *Cymbopogonflexuosus* . *Chemico-Biological Interactions* vol. 179 (2009); pages 160-168.

SOENARKO, S. The genus *Cymbopogon* Sprengel (Gramineae). *Reinwardtia*, vol. 9, pages 225-375, 1977.

SON, Y. O.; KIM, J.; LIM, L. C.; CHUNG, Y.; CHUNG, G. H.; LEE, J. C. Ripe fruits of *Solanum nigrum* inhibits growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 41, pages 1421-1428, 2003.

SPADACIO, C. et al . Medicinas Alternativas e Complementares: uma metassíntese. Caderno de Saúde Pública. Rio de Janeiro, vol. 26, n.1, paginas .7-13, Jan.2010

STEVENSEN, C. J. Aromatherapy in dermatology. Clinics in Dermatology, vol. 16, n.6, pages 689-694, 1998. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X98000583> >.

SVÁTEK, R. S.; HOLLENBECK, B. K.; HOLMÄNG, S.; LEE, R.; KIM, S. P.; STENZL, A.; LOTAN, Y. The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. European Urology, vol. 66 (2), pages 253–62, 2014.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; KRUGER, D.; GNANN, W.; WECKE, J. Microcalorimetric and electron microscopic investigation on the effects of essential oil from *Cymbopogondensiflorus* on *Staphylococcus aureus*. Microbios, vol. 88, pages 55-62, 1996.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; TSHILANDA, D.; BABADY, B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogondensiflorus*. Fitoterapia, vol. 71, pages 69-71, 2000.

TEPLY, B. A.; KIM, J. J. Systemic therapy for bladder cancer – a medical oncologist’s perspective. Journal of Solid Tumors, vol.4 (2), pages 25–35, 2014.

VALDEZ, B. C.; WANG, G.; MURRAY, D.; NIETO, Y.; LI, Y.; SHAH, J.; TURTURRO, F.;

XU, J.; XU, L.; LI, L.; YOU, Q.; CHA, L. HIF1A Pro582Ser polymorphism and digestive tract cancers: a meta analysis of case control studies. Genetics and Molecular Research 13 (3): 5732-5744 (2014).

WANG, M.; WEBER, D. M.; CHAMPLIN, R. E.; QAZILBASH, M. H.; ANDERSSON, B. S. Mechanistic studies on the synergistic cytotoxicity of the nucleoside analogs gemcitabine and clofarabine in multiple myeloma: relevance of p53 and its clinical implications. Experimental Hematology, vol. 41; pages 719–730, 2013.

WANG, X.; QIU, Z.; ZHANG, G.; XU, S.; GAO, Q.; YANG, Z. MicroRNA-204 targets JAK2 in breast cancer and induces cell apoptosis through the STAT3/BCI-2/survivin pathway. Int J Clin Exp Pathol 2015;8(5):5017-5025

WATSON, L. & DALLWITZ, M. J. The grass genera of the world. Wallingford: C.A.B. International. 1992.

ZHANG, W.; ZHANG, T.; LOU, Y.; YAN, B.; CUI, S.; JIANG, L.; HAN, B. Placental growth factor promotes metastases of non-small cell lung cancer through MMP9. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2015;37:1210-1218.

ZHE ZHANG , GUOJUN ZHANG , CHUIZE KONG. Targeted inhibition of Polo-like kinase 1 by a novel small-molecule inhibitor induces mitotic catastrophe and apoptosis in human bladder cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Vol 20, No 10, 2016 pages 1-10



ESCOLA DE FARMÁCIA



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia

### CERTIFICADO DE CORREÇÃO

Certifico que a discente Gizele Lucia da Costa Pereira, número de matrícula 15.2.5905, defendeu a Monografia intitulada "Análise do efeito antitumoral do óleo essencial de *Cymbopogon densiflorus* sobre células de câncer de bexiga" em 03 de Dezembro de 2018 e REALIZOU TODAS AS CORREÇÕES REQUERIDAS PELA COMISSÃO AVALIADORA.

Ouro Preto, 17 / 12 / 2018

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Glenda Nizioli da Silva  
Orientadora  
(DEACL-EF-UFOP)