



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



BRUNO IRAQUITAN MIRANDA DA SILVA

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE MONO E SESQUITERPENOS

Recife
2022

BRUNO IRAQUITAN MIRANDA DA SILVA

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE MONO E SESQUITERPENOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas Biológicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva.

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Bruno Iraquitan Miranda da
Atividade antitumoral de mono e sesquiterpenos / Bruno Iraquitan Miranda da Silva.
- 2022.

63 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar.

Coorientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife,
2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Câncer. 2. Farmacologia. 3. Medicamentos – Toxicologia. I. Aguiar, Jaciana dos Santos (orientadora). II. Silva, Teresinha Gonçalves da (coorientadora). III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022 - 045

BRUNO IRAQUITAN MIRANDA DA SILVA

ATIVIDADE ANTITUMORAL DE MONO E SESQUITERPENOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27 / 01 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Gardênia Carmen Gadelha Militão (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder força para enfrentar todos os obstáculos que surgiram no meio do caminho.

A minha família, mãe Eliane Ana e filhos Nicollas Iraquitã e Diana Júlia, por todo amor e carinho.

A minha orientadora Jaciana dos Santos Aguiar, por te acreditado em mim, até quando nem eu mesmo acreditava mais, por ter me orientado em tudo, em todos os aspectos, durante todos esses anos, pela amizade e pelo carinho materno. Minha orientadora nunca foi título, nem cargo, sempre foi e continua sendo uma pessoa, essa é sua maior qualidade e motivo de meu orgulho e admiração.

A minha co-orientadora Teresinha Gonçalves da Silva que mesmo um pouco mais distante, nunca me negou ajuda e que também vem me acompanhado e orientando durante todos esses anos.

Ao amigo Bruno de Oliveira Veras, seu enorme entusiasmo pela pesquisa me inspirou e me ajudou a prosseguir.

Aos meus colegas de trabalho Edeones França, Debora Nepomuceno e Leopoldina Augusta, pelas palavras e conselhos ditos nos momentos que mais precisava.

Aos colegas de laboratório Cléber José, Erika Arruda e Erwelly Barros por todo apoio e ajuda.

A UFPE por me acolher como aluno e como profissional e as pessoas que fizeram parte de minha trajetória durante esses longos 12 anos.

EPÍGRAFE

“Veni, vini, vici”

Júlio César

RESUMO

O câncer é a segunda maior causa de mortes prematuras no mundo e tem como seu principal tratamento a quimioterapia, que está associada a fortes efeitos adversos que causam enfraquecimento dos pacientes. Por isso, há uma demanda crescente na prospecção de fármacos anticâncer oriundos de produtos naturais, por serem considerados menos tóxicos. Nesse contexto, a classe dos terpenos representa uma alternativa no combate ao câncer, pois, alguns dos compostos dessa classe já foram descritos como efetivos antitumorais de baixa toxicidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral de um painel de 17 terpenos, mono e sesquiterpenos. Para isto, foi realizado o *screening* inicial dos 17 terpenos pelo ensaio do MTT em linhagens de células tumorais humanas e não tumoral. Os compostos com percentual de inibição do crescimento > 75% tiveram os valores de concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI₅₀) definidos, do composto que apresentou melhores resultados, foram realizados ensaio hemolítico em eritrócitos murinos, análise morfológica e de formação de colônias em células HeLa. E, ainda, o estudo de docking molecular utilizando os receptores p53, Bcl2-xL, tubulina e DNA. Os seguintes compostos monoterpreno; α -pineno e sesquiterpenos; (+)-valenceno, β -cariofileno, (-)- α -copaeno e nerolidol, inibiram acima de 75 %, em 72h, uma linhagem celular ou apresentaram inibição específica para linhagens tumorais, esses compostos tiveram valores CI₅₀ definidos. Entre os 17 compostos, o nerolidol foi selecionado, pois mostrou especificidade para as linhagens tumorais MCF-7 e HeLa, apresentando valores de CI₅₀ de 17,63 e 13,50 μ g/mL, respectivamente. Além disso, foi calculado o índice de seletividade onde foi observado que o nerolidol apresentou os maiores valores de seletividade tanto para linhagem MCF-7 quanto para HeLa, em comparação com a linhagem saudável L929. Na análise morfológica, o nerolidol já na menor concentração testada (7,5 μ g/mL), induziu alterações celulares como a formação de vacúolos, presença de núcleos condensados e a diminuição dose dependente das células viáveis. O nerolidol causou hemólise nos eritrócitos murinos de forma dose dependente, no entanto, parece ser seguro até a concentração de 39 μ g/mL onde apenas 2,7 % dos eritrócitos foram hemolisados, além disso, apresentou concentração efetiva de 50% (CE₅₀) alta de 736,8 μ g/mL. O nerolidol teve efeito negativo na formação de colônia de células HeLa, reduzindo em até 93% na maior dose testada (15 μ g/mL), no entanto, os efeitos inibitórios do nerolidol foram reversíveis, uma vez que, as células retomaram o crescimento após suspensão do tratamento. Dentre os compostos analisados, em concordância com os estudos *in vitro*, o nerolidol apresentou melhores resultados de ancoragem, realizando ligações de hidrogênio com os receptores Bcl2-xL,

tubulina e fragmento de DNA. A provável interação do nerolidol com esses receptores indicam interferência na divisão celular e indução da apoptose. Em conclusão, dos 17 terpenos analisados, o nerolidol apresentou maior citotoxicidade frente às linhagens tumorais e segurança frente às células saudáveis testadas, ademais, ambos os estudos *in vitro* e *in silico*, mostram indícios que o nerolidol esteja causando a morte celular por apoptose, embora, outros mecanismos intermediários como autofagia e bloqueio do ciclo celular possam estar envolvidos.

Palavras-chave: terpenos; compostos naturais; citotoxicidade; anticâncer; *docking* molecular.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of premature death in the world and its main treatment is chemotherapy, which is associated with strong adverse effects that weaken patients. Therefore, there is a growing demand in prospecting anticancer drugs from natural products, as they are considered less toxic. In this context, the terpene class represents an alternative in the fight against cancer, since some of the compounds of this class have already been described as effective antitumor agents of low toxicity. The objective of this work was to evaluate the antitumor activity of a panel of 17 terpenes, mono and sesquiterpenes. For this, the initial screening of the 17 terpenes was performed by the MTT assay in human and non-tumor tumor cell lines. The compounds with growth inhibition percentage > 75% had the concentration values that inhibit 50% of cell growth (IC_{50}) defined, of the compound that presented the best results, hemolytic assay was performed in murine erythrocytes, morphological analysis and colony formation in HeLa cells. And yet, the study of molecular docking using p53, Bcl2-xL, tubulin and DNA receptors. The following monoterpene compounds; α -pinene and sesquiterpenes; (+)-valencene, β -caryophyllene, (-)- α -copaene and nerolidol, inhibited above 75%, in 72h, a cell line or showed specific inhibition for tumor lines, these compounds had defined IC_{50} values. Among the 17 compounds, nerolidol was selected because it showed specificity for MCF-7 and HeLa tumor lines, with IC_{50} values of 17.63 and 13.50 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In addition, the selectivity index was calculated, where it was observed that nerolidol presented the highest selectivity values for both MCF-7 and HeLa lines, compared to the healthy L929 lines. In the morphological analysis, nerolidol already at the lowest concentration tested (7.5 $\mu\text{g/mL}$), induced cellular changes such as the formation of vacuoles, the presence of condensed nuclei and a dose-dependent decrease in viable cells. Nerolidol caused hemolysis in murine erythrocytes in a dose-dependent manner, however, it seems to be safe up to a concentration of 39 $\mu\text{g/mL}$ where only 2.7% of erythrocytes were hemolyzed, in addition, it presented a high effective concentration of 50% (EC_{50}). of 736.8 $\mu\text{g/ml}$. Nerolidol had a negative effect on colony formation of HeLa cells, reducing it by up to 93% at the highest dose tested (15 $\mu\text{g/mL}$), however, the inhibitory effects of nerolidol were reversible, since cells resumed growth after treatment suspension. Among the compounds analyzed, in agreement with the in vitro studies, nerolidol presented better anchoring results, performing hydrogen bonds with the Bcl2-xL, tubulin and DNA fragment receptors. The probable interaction of nerolidol with these receptors indicates interference in cell division and induction of apoptosis. In conclusion, of the 17 terpenes

analyzed, nerolidol showed greater cytotoxicity against tumor lines and safety against healthy cells tested, in addition, both in vitro and in silico studies show evidence that nerolidol is causing cell death by apoptosis, although , other intermediary mechanisms such as autophagy and cell cycle blockage may be involved.

Keywords: terpenes; natural compounds; cytotoxicity; anticancer; molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1 –	Números de casos de câncer atribuíveis ao estilo de vida e fatores ambientais, que poderiam ser evitados, na França em 2015	18
Figura 2 –	Os dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, por sexo, excerto pele não melanoma	19
Figura 3 –	Etapas da carcinogênese	20
Figura 4 –	Aspectos morfológicos comparativos entre os tipos de morte celular: apoptose e necrose	23
Figura 5 –	Processo de autofagia	24
Figura 6 –	Exemplos de produtos naturais que induzem morte celular não-apoptótica	27
Figura 7 –	Biossíntese dos terpenos: via metileritriol-4-fosfato (MEP) e mevalonato (MVA)	29
Figura 8 –	Fases de execução do docking molecular	32

ARTIGO 1 - ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SILICO* DE TERPENÓIDES NATURAIS EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER HUMANO

Figura 1 –	Estrutura química dos compostos terpenóides	37
Figura 2 –	Valores de CI_{50} do nerolidol e paclitaxel frente células HeLa, após incubação de 24, 48 e 72 h	43
Figura 3 –	Percentual de hemólise do nerolidol, em eritrócitos murinos, após incubação de 2 h	44
Figura 4 –	Análise morfológica de células HeLa, tratadas com nerolidol e paclitaxel por 48 h	45
Figura 5 –	Efeito do nerolidol no percentual de formação de colônias de células HeLa	46
Figura 6 –	Sobreposição dos ligantes co-cristalizados	46
Figura 7 –	Representação em 2D e 3D das interações entre nerolidol e os receptores	49

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 – Fármacos quimioterápicos e seus respectivos efeitos adversos.	25
Tabela 2 – Valores de CI_{50} do nerolidol em diferentes linhagens de células tumorais.	30

ARTIGO 1 - ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SILICO* DE TERPENÓIDES NATURAIS EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER HUMANO

Tabela 1 – Valores de percentual de inibição celular (IC%) dos terpenos (25 $\mu\text{g/mL}$) e paclitaxel (30 $\mu\text{g/mL}$) frente linhagens de células tumorais e não tumoral (L929), após incubação de 72 h	41
Tabela 2 – Valores de CI_{50} dos terpenos e paclitaxel frente linhagens celulares, após incubação de 72 h	42
Tabela 3 - Índice de Seletividade das linhagens tumorais contra linhagem não tumoral	43
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos compostos obtidos por método quântico semi-empírico PM7 a partir do pacote computacional MOPAC2016	47
Tabela 5 - Valores de energia de interação obtidos por simulação de <i>docking</i> molecular	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT	Software AutoDockTools
AP-1	Proteína ativadora 1
CAT	Catalase
CE ₅₀	Concentração efetiva de 50 %
CI ₅₀	Concentração que inibe em 50 % o crescimento celular
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DL ₅₀	Dose letal mediana
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
ELA	Esclerose lateral aminotrófica
EPM	Erro padrão médio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPP	Geranyl pirofosfato
GPx	Glutathione peroxidase
HIF1 α	Fator induzível por hipóxia 1- α
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC%	Percentual de inibição celular
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPP	Isopentil pirofosfato
IS	Índice de seletividade
LC3	Cadeia leve 3 da proteína associadas a microtúbulos
MCA	Morte celular acidental
MCR	Morte celular regulada
MDR	Multidrogas resistente
MVA	Via do mevalonato
MEP	Via metileritriol-4-fosfato
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
PDB	<i>Protein data bank</i>
RMSD	<i>Root mean square deviations</i>
SF	<i>Scoring function</i>
SOD	Superóxido dismutase
TORC1	Complexo 1 da proteína alvo da rapamicina
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	GERAL	16
2.2	ESPECÍFICOS	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	CÂNCER	17
3.1.1	Epidemiologia do câncer	17
3.1.2	Carcinogênese e estresse oxidativo	19
3.2	MORTE CELULAR: APOPTOSE, NECROSE E AUTOFAGIA	22
3.3	PRODUTOS NATURAIS COMO ALTERNATIVA À QUIMIOTERAPIA	24
3.4	TERPENOS	27
3.4.1	Nerolidol, um sesquiterpeno promissor	29
3.5	DOCKING MOLECULAR	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	ARTIGO 1- ESTUDOS IN VITRO E IN SILICO DE TERPENÓIDES NATURAIS EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER HUMANO	34
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE A – ANTICANCER ACTIVITY OF MONOTERPENES: A SYSTEMATIC REVIEW	62
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	63

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico referente a um conjunto de mais de 100 diferentes tipos de doenças, que manifestam características típicas como crescimento desordenado de células e a capacidade de invadir tecidos adjacentes ou órgãos distantes. Em divisão acelerada, células tumorais tendem a ser agressivas e incontroláveis, podendo se espalhar para outras regiões do corpo (INCA, 2021). O câncer representa a segunda maior causa de morte no mundo, ficando atrás apenas de doenças cardiovasculares. Em países como Austrália, Estados Unidos e Canadá, o câncer ocupa o primeiro lugar em causas de mortes. Esse aumento na taxa de mortalidade por câncer se deve em parte ao envelhecimento, fatores associados ao sedentarismo e diminuição nas taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares (BRAY et al., 2018).

A quimioterapia é o principal tratamento para pacientes com câncer, no entanto, a sua prática está relacionada a efeitos adversos, que pode variar entre sintomas leves como fadiga, queda de cabelo, diarreia ou constipação (PEARCE et al., 2017) a casos mais graves como mielossupressão e toxicidade a órgãos (NURGALI; JAGOE; ABALO, 2018; MA et al., 2020). Apesar dos esforços no desenvolvimento de quimioterápicos eficazes, os efeitos adversos graves e o desenvolvimento de multidroga resistente (MDR) ainda são os principais obstáculos no tratamento efetivo do câncer (SHRESTHA et al., 2016).

Nesse contexto, a busca por compostos bioativos provenientes de produtos naturais têm sido uma alternativa amplamente explorada, em particular, produtos de origem vegetal que há séculos vem sendo utilizados tradicionalmente para tratamento de doenças. As plantas medicinais são fontes ricas em compostos bioativos, como alcalóides, terpenos, flavonoides, compostos fenólicos, entre outros (LICHOTA; GWOZDZINSKI, 2018). Além disso, alguns medicamentos quimioterápicos que são de uso rotineiro na clínica médica, como exemplo, paclitaxel e vincristina foram inicialmente isolados de espécies vegetais *Taxus brevifolia* e *Catharanthus roseus*, respectivamente.

Os terpenos representam uma importante classe de metabólitos secundários de plantas, sendo a maior classe de compostos encontrados em óleos essenciais, especificamente, mono e sesquiterpenos. Há essa classe de compostos, são atribuídos diversos tipos de atividades biológicas incluindo, atividade anti-inflamatória (MARQUES et al., 2019), antinociceptiva (JANSEN et al., 2019), inseticida (ANDRADE-OCHOA et al., 2018), antiviral (SANDARGO et al., 2019), antimicrobiana (BADAWY et al., 2019), antioxidante (SHARIFI-RAD et al.,

2018) e atividade anticâncer para diversas linhagens de células tumorais (AMBROŽ et al., 2015, 2019; SILVA et al., 2021).

Tendo em vista o potencial anticâncer expressado pela classe dos terpenos, neste trabalho um painel de 17 terpenos, mono e sesquiterpenos, foram avaliados quanto a sua atividade anticâncer *in vitro*. O composto mais efetivo foi utilizado para estudos de *docking* molecular em receptores moleculares associados ao câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a capacidade antitumoral, *in vitro* e *in silico*, de um painel de 17 terpenos, mono e sesquiterpenos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade dos terpenos em linhagens de células tumorais e não-tumorais;
- Analisar a morfologia de células HeLa, após tratamento com o nerolidol;
- Analisar o impacto do nerolidol na formação de colônias de células HeLa;
- Avaliar a capacidade de ancoragem aos receptores moleculares relacionados ao câncer dos compostos que demonstrarem melhor atividade citotóxica.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÂNCER

O câncer, também citado como neoplasia ou tumor maligno, é um conjunto de doenças que se manifesta em qualquer parte do corpo, ocorre quando células anormais crescem de maneira descontrolada, além de seu limite normal, para invadir tecidos adjacentes (invasão) e/ou espalhar para outros órgãos distantes (metástase). O câncer representa a primeira ou a segunda maior causa de morte no mundo, sendo responsável pela morte de mais de 10 milhões de pessoas, em 2020 (SUNG et al., 2021).

A carcinogênese, a transformação de células saudáveis em células tumorais, é um processo em várias etapas, que em sua forma básica envolve a mutação do DNA genômico, formando uma célula pré-cancerígena, seguida pelo crescimento seletivo desta célula. Este crescimento pode ser estimulado por um aumento na taxa de divisão celular e/ou uma diminuição na taxa de mortalidade (apoptose). À medida que a célula mutada se divide, outras alterações epigenética e genéticas ocorrem no local da lesão inicial no DNA, ou seja, as mutações são sucessivas e acumulativas (MOOLGAVKAR; LUEBECK, 2020).

Geralmente, os danos ao DNA presentes na carcinogênese são promovidos por desregulação dos mecanismos celulares que garantem o bom funcionamento do ciclo celular. Durante decurso do ciclo celular, existem pontos de verificação que impedem que danos no DNA sejam passados adiante, as “células filhas”, esses pontos de verificação a princípio bloqueiam o ciclo celular, para que os mecanismos de reparo possam resolver o problema detectado, quando o reparo não é possível, a célula é encaminhada a morte celular programada, apoptose (SHERR; BARTEK, 2017).

3.1.1 Epidemiologia do câncer

A incidência e mortalidade por câncer vêm crescendo rapidamente pelo mundo, as razões são multifatoriais, no entanto, refletem o envelhecimento e crescimento populacional, bem como, fatores associados ao desenvolvimento socioeconômico, além disso, a diminuição nas taxas de mortalidade por acidente vascular cerebral e doenças cardíacas coronárias, esses fatores contribuem para ascensão do câncer como um dos maiores causadores de mortalidade no mundo (BRAY et al., 2018).

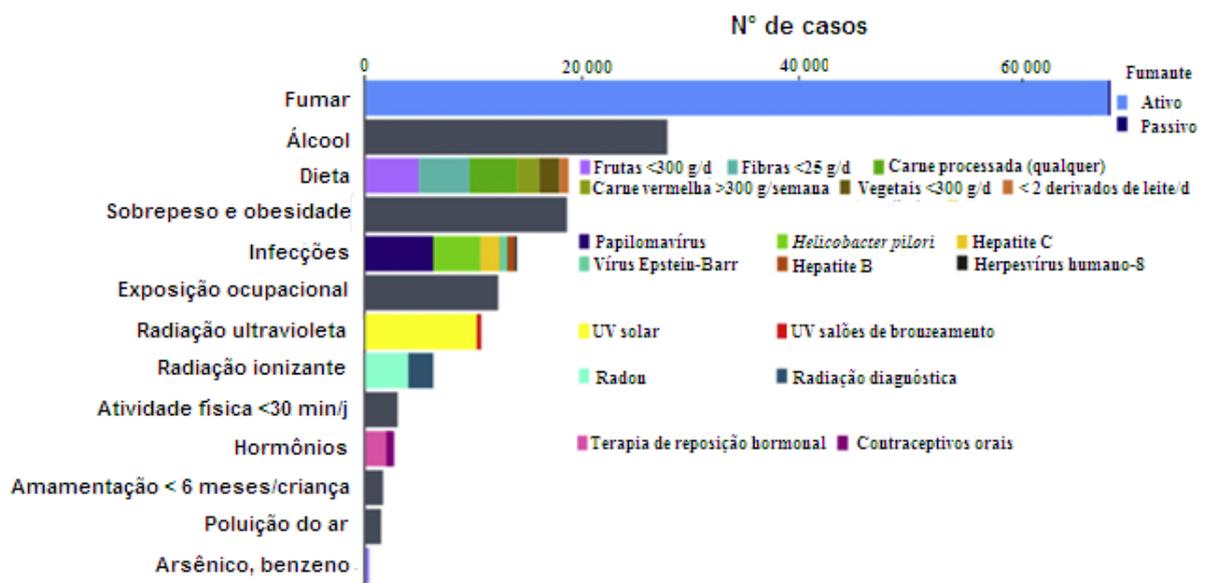
O perfil epidemiológico do câncer pode estar diretamente associado à situação econômica de um país. Por exemplo, em países emergentes pode-se observar uma transição,

onde há uma diminuição nas taxas de cânceres relacionados a processos infecciosos como câncer de colo do útero, estômago e fígado, e em contrapartida, aumento das taxas de cânceres de pulmão, mama, colorretal e próstata, que estão associados à melhoria da qualidade de vida e incorporação de hábitos como sedentarismo, tabagismo e maior consumo de alimentos industrializados (BRAY et al., 2018).

Segundo *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a agência especializada em câncer da *World Health Organization* (WHO), de 30 a 50% de todos os casos de câncer no mundo poderiam ser evitados, e a prevenção do câncer depende da conscientização da população para reduzir a exposição aos agentes cancerígenos, como fumaça de cigarro, bebidas alcoólicas, níveis perigosos de poluição e raios ultravioleta, além disso, pode-se acrescentar mudanças de hábito como uma alimentação saudável e prática de exercícios físicos (BRAY et al., 2019).

Com enfoque na prevenção, a Seção de Vigilância do Câncer da IARC produziu em 2018 um relatório com as causas já estabelecidas de câncer na França, e concluíram que 41% dos cânceres poderiam ser evitados, com práticas simples de diminuição no consumo de bebidas alcoólicas e cigarros, controle de peso, prática de exercício físicos e redução da exposição à radiação. Tornando esse tipo de estudo uma valiosa ferramenta entre as autoridades como base de campanhas nacionais de prevenção ao câncer (BRAY et al., 2019; IARC, 2018), os fatores de risco apresentados neste relatório estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Números de casos de câncer atribuíveis ao estilo de vida e fatores ambientais, que poderiam ser evitados, na França em 2015.



Fonte: (SOERJOMATARAM et al., 2018).

O câncer ocupa o 2º lugar em causa de morte prematura no Brasil, onde é estimado o número de 625.000 novos casos para cada ano do triênio 2020-2022, segundo a última estimativa realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA). Neste cenário, os tipos de câncer mais incidentes são câncer de pele não melanoma (177 mil), mama e próstata (66 mil cada), colorretal (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Quando separados por sexo os tipos de câncer mais frequentes em homens serão, próstata, pele não melanoma, colorretal, pulmão e estômago, já, para mulheres serão, mama, pele não melanoma, colorretal, colo do útero e pulmão (INCA, 2019), os dez tipos de câncer mais incidentes por sexo no Brasil, em 2020, estão listados na Figura 2.

Figura 2 - Os dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, por sexo, excerto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%
			Mulheres				

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: (INCA, 2019)

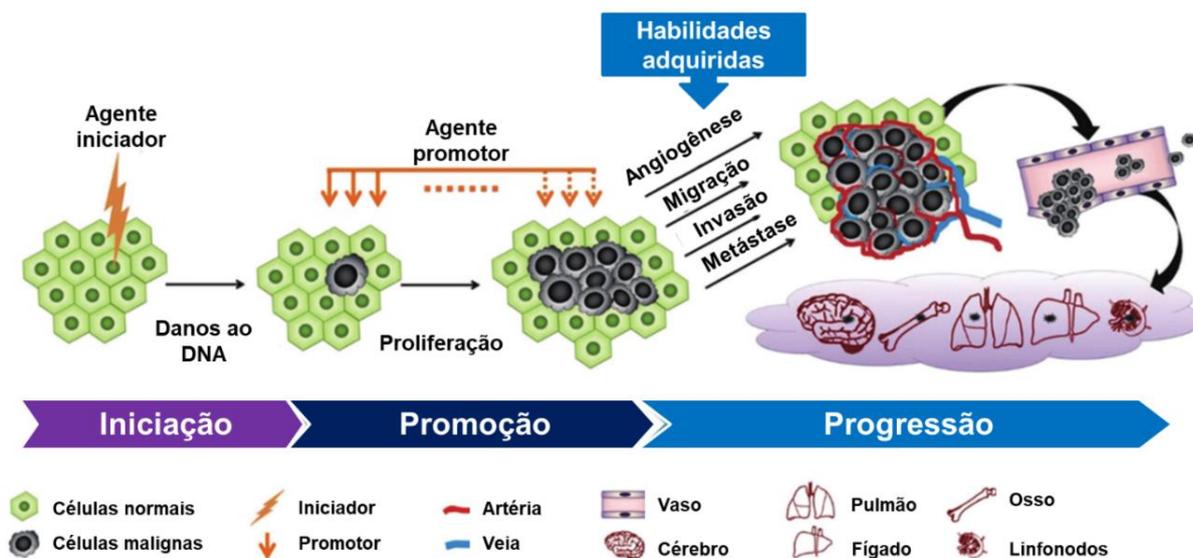
3.1.2 Carcinogênese e estresse oxidativo

Experimentalmente a carcinogênese pode ser dividida em 3 etapas: iniciação, promoção e progressão (Figura 3). A iniciação é marcada pela modificação no DNA genômico formando uma célula pré-neoplásica iniciada, essa mutação pode ser induzida por um agente carcinogênico (iniciador) ou fatores epigenéticos. Na iniciação, a mutação não é suficiente para induzir a transformação maligna, no entanto, uma vez iniciada a célula tem seu DNA modificado permanentemente e suas células filhas herdaram a mutação, estando suscetível a promoção (KLAUNIG; WANG, 2018; LIU et al., 2015).

A promoção envolve a divisão clonal da célula iniciada. Agentes carcinogênicos que atuam em células iniciadas são chamados de promotores, estes favorecem a proliferação celular seja por autossuficiência de sinais proliferativos, insensibilidade aos sinais antiproliferativos e/ou escape da morte celular. Os eventos desta fase são dependentes da dose

e reversíveis após a remoção do estímulo promotor. A progressão, o terceiro e último estágio da carcinogênese, envolve mudanças celulares e moleculares que vão se acumulando desde a iniciação. Esta fase é irreversível, e envolve instabilidade genética, alterações na ploidia nuclear e perda da integridade cromossômica, que estão associadas às habilidades adquiridas típicas de células neoplásicas (Figura 3) (KLAUNIG; WANG, 2018; LIU et al., 2015).

Figura 3 - Etapas da carcinogênese.



Fonte: (LIU et al., 2015).

Um exemplo importante de agente promotor da carcinogênese são as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), eles incluem os radicais livres hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) e moléculas não radicais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são produzidas por fonte endógenas incluindo organelas (peroxissomos, retículo endoplasmático e mitocôndrias) e células inflamatórias, também podem ser produzidas através de fontes exógenas como radiação, metais, patógenos, agentes quimioterápicos e xenobióticos (KLAUNIG; WANG, 2018).

Durante o metabolismo aeróbico normal, EROs são geradas continuamente em pequenas quantidades. O equilíbrio entre geração e eliminação de EROs é mantido por antioxidantes endógenos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), sendo este o principal sistema de defesa antioxidante do organismo, adicionalmente, antioxidantes exógenos como vitaminas e compostos polifenólicos auxiliam na eliminação de EROs (LEE et al., 2012). A eliminação de EROs pelo sistema antioxidante SOD-CAT atua inicialmente na conversão dos ânions superóxidos em H_2O_2 pela ação de SOD

e, em seguida, o H_2O_2 é convertido em água e oxigênio pela CAT (JAYAKUMAR et al., 2018).

O estresse oxidativo corresponde ao desequilíbrio entre a geração e eliminação de EROs no interior das células, este estado causa danos às células por ativação anormal de moléculas de sinalização e danos a biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, que podem provocar o surgimento de diversas doenças crônicas degenerativas incluindo doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (LEE et al., 2012).

O estresse oxidativo prolongado pode induzir mutações no DNA seja por quebra de fita simples ou dupla e modificações nas bases nitrogenadas, quando não reparados, esses danos ao DNA resultam em mutação permanente, erros de replicação, instabilidade genômica e em casos mais intensos, morte celular (LEE et al., 2012).

Importante na carcinogênese, o estresse oxidativo age inibindo vias de defesa antioxidante e mecanismos de reparo de DNA. Além disso, EROs podem ativar uma série de vias de transdução de sinal, como HIF1 α (fator induzível por hipóxia 1- α), Nrf2 (fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2), AP-1 (proteína ativadora 1) e NF- κ B (Fator nuclear kappa B) que transcrevem genes reguladores de crescimento celular. O estresse oxidativo tem sido associado tanto como fator causador quanto modulador do câncer (KLAUNIG; WANG, 2018).

Como discutido acima, o aumento moderado de EROs contribui para o desenvolvimento tumoral, uma vez que está envolvida em diferentes vias de sinalização e indução de danos ao DNA, no entanto, EROs também podem desencadear morte celular programada, principalmente por indução da apoptose, através da interação com ligantes indutores de morte (TNF α e FAS) aumentando a montagem de DISC (complexo de sinalização indutor de morte) e ativação das caspases efetoras (PERILLO et al., 2020).

Vários medicamentos por diferentes vias de sinalização induzem apoptose via estresse oxidativo, é o caso dos anticorpos monoclonais e inibidores de tirosina quinase utilizados na quimioterapia, que agem principalmente através do aumento na geração de EROs intracelular. Além disso, outros quimioterápicos como a procarbazina, doxorrubicina, 5-fluorouracil e compostos de platina agem de forma similar elevando os níveis de EROs (PERILLO et al., 2020).

As espécies reativas de oxigênio também podem induzir autofagia através da inativação de reguladores negativos como o TORC1 (complexo 1 da proteína alvo da rapamicina) e aumento dos autofagossomos associados a LC3 (cadeia leve 3 da proteína

associadas a microtúbulos). Em níveis críticos EROs podem provocar ferroptose, um mecanismo de morte dependente de ferro intracelular (PERILLO et al., 2020).

3.2 MORTE CELULAR: APOPTOSE, NECROSE E AUTOFAGIA

A morte celular pode ser dividida em morte celular acidental (MCA) e morte celular regulada (MCR), com base em aspectos funcionais. MCA é um processo biológico não controlado, ocasionado em resposta a agressões físicas (altas pressões, temperaturas ou forças osmóticas), químicas (variações extremas de pH) ou mecânica (forças de cisalhamento) (GALLUZZI et al., 2018).

A morte celular regulada pode ocorrer sem que haja perturbação do microambiente, sendo assim, realizada apenas para o desenvolvimento ou renovação do tecido. Ademais, a MCR pode ser desencadeada por perturbações do meio intracelular ou extracelular, quando esta situação de estresse é muito intensa ou prolongada, a morte celular é ativada eliminando células inúteis ou potencialmente perigosas para o organismo (GALLUZZI et al., 2018).

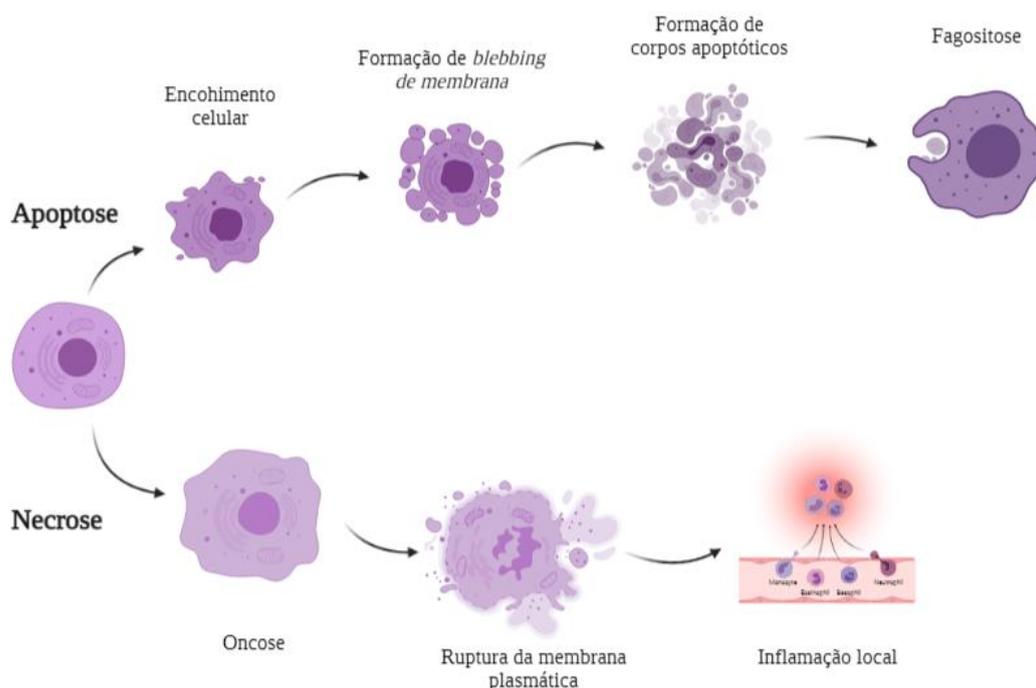
Distúrbios nos mecanismos de controle de morte celular geralmente acarretam em doenças graves ao organismo, por exemplo, doenças autoimunes e cânceres ocorrem quando os mecanismos de morte são bloqueados, de maneira oposta, a morte celular excessiva contribui para doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Parkinson, Alzheimer, Huntington e esclerose lateral aminotrófica (ELA) (BOCK; TAIT, 2020).

Os três tipos clássicos de morte celular foram definidos com base apenas nos aspectos morfológicos de tecidos e células individuais, foram eles: necrose como exemplo de MCA, apoptose e autofagia MCR. Com o avanço das tecnologias atreladas a ciência foram surgindo outras definições de morte celular orientadas por perspectivas moleculares, bioquímicas e funcionais, como, necroptose, ferroptose, piroptose, senescência celular, catástrofe mitótica e etc (GALLUZZI et al., 2018).

Com base nos aspectos morfológicos, a necrose pode ser determinada por um aumento do volume citoplasmático (oncoses) que adquire um aspecto translúcido, agregação da cromatina, inchaço das organelas citoplasmáticas e ruptura da membrana plasmática com consequente liberação do conteúdo citoplasmático provocando inflamação local, já, a apoptose é diferenciada por encolhimento celular, formação de bolhas (*blebbings*) na membrana plasmática, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, perda da aderência às células adjacentes e a matriz extracelular e, por fim, formação de pequenas vesículas

chamadas de corpos apoptóticos, que são detectadas e fagocitadas por macrófagos no organismo (Figura 4) (MOHAMMADINEJAD et al., 2019).

Figura 4 – Aspectos morfológicos comparativos entre os tipos de morte celular: apoptose e necrose.



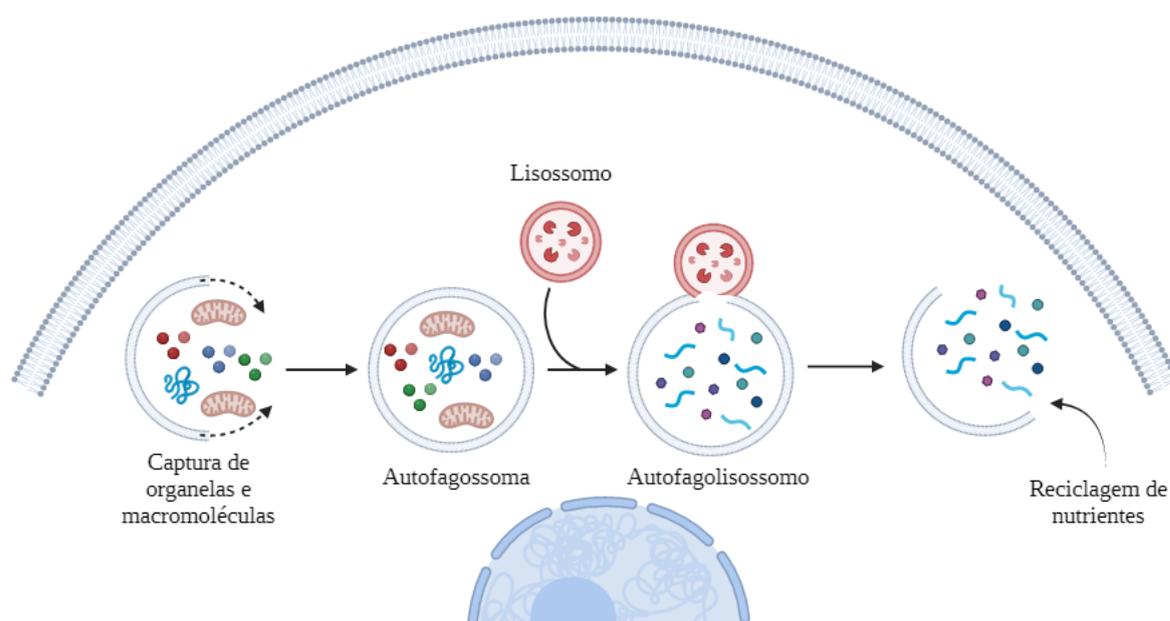
Fonte: o autor (2022). Imagem foi criada como o BioRender.

Em cultura de células a diferenciação morfológica entre necrose e apoptose é dificultada, pois, a necrose é geralmente visualizada em seu estado final com presença de fragmentos celulares, entretanto, o que é identificado como restos celulares podem ser restos de células apoptóticas tardias em que os corpos apoptóticos perderam sua integridade (D'ARCY, 2019).

A autofagia é uma via catabólica ativada em situações de estresse ou privação de nutrientes, que mantém a homeostase celular através da reciclagem de metabólitos oriundos da degradação de organelas e macromoléculas citoplasmáticas. Frequentemente em células tumorais a autofagia é induzida para que haja continuidade do crescimento, sobrevivência e malignidade de forma autônoma. A princípio, a autofagia representa um mecanismo que sustenta a sobrevivência, no entanto, quando a situação de estresse é prolongada ou excessiva a célula inicia o processo de morte (WHITE; LATTIME; GUO, 2021).

Resumidamente, na autofagia, as cargas citoplasmáticas (organelas, proteínas, lipídios, glicogênio) são sequestradas por um fagóforo, de membrana dupla, que se expande e se une formando o autofagossomo, que pode se fundir com um lisossomo para formar um autofagolisossomo, onde a carga é degradada. Por fim, os produtos da degradação são liberados no citosol para que possam ser utilizados como substrato no metabolismo e/ou biosíntese (Figura 5). Dessa forma, a autofagia age na renovação de proteínas intracelulares e garante a homeostase celular em situações de privação nutricional (MOHAMMADINEJAD et al., 2019; WHITE; LATTIME; GUO, 2021).

Figura 5 – Processo de autofagia.



Fonte: o autor (2022). Imagem foi criada como o BioRender.

3.3 PRODUTOS NATURAIS COMO ALTERNATIVA À QUIMIOTERAPIA

A citotoxicidade é algo inerente à quimioterapia, pois foi projetada para danificar células humanas. Muitos dos efeitos adversos dos quimioterápicos são brandos, como febre, vômito, náuseas, porém, pode provocar efeitos potencialmente fatais ou debilitantes graves aos pacientes. Cada medicamento, dentro de cada classe, tem seu próprio conjunto de reações adversas (Tabela 1) que podem causar comprometimento do paciente e deterioração da qualidade de vida (SINGH et al., 2018).

Uma das estratégias utilizadas para reduzir os efeitos adversos é fazer uso de combinações, em doses menores, de diferentes agentes quimioterápicos, por exemplo, a combinação de 5-fluorouracil, epirrubina e ciclofosfamida (FEC) é utilizada no tratamento

de câncer de mama (JENKINS et al., 2006), já, as combinações de gencitabina e cisplatina (GC) ou metotrexato, vimblastina, doxorubicina e cisplatina (MVDC) são utilizadas no tratamento de câncer de bexiga metastático (MAASE et al., 2000).

Tabela 1 - Fármacos quimioterápicos e seus respectivos efeitos adversos.

Agente quimioterápico	Classe farmacológica	Efeitos adversos	Referência
Paclitaxel	Taxanos	Reações de hipersensibilidade (dispneia, urticária e hipotensão), neutropenia, neurotoxicidade, cardiotoxicidade.	(ROWINSKY; DONEHOWER, 1995)
Doxorrubicina	Antraciclina	Leucopenia, diarreia, mucosite, e toxicidade a vários órgãos do corpo principalmente ao coração.	(INJAC; STRUKELJ, 2008; MOHAJERI; SAHEBKAR, 2018)
Ciclofosfamida	Agentes alquilantes	Danos à bexiga (cistite hemorrágica), imunossupressão e alopecia.	(FRAISER; KANEKAL; KEHRER, 1991)
5-fluorouracil	Antimetabólitos	Estomatite, esofagofaringite, diarreia, alterações dermatológicas, alopecia, depressão hematopoiética, febre, neurotoxicidade e cardiotoxicidade.	(KENNEDY, 1999)
Bleomicina	Antibióticos glicopeptídicos	Toxicidade pulmonar e fibrose intestinal.	(JULES-ELYSEE; WHITE, 1990)
Vincristina	Alcalóides da vinca	Grande potencial neurotóxico, secreção inadequada de hormônios antidiuréticos e potencialização de doenças neurológica preexistente.	(ROSENTHAL; KAUFMAN, 1974)

Fonte: o autor (2022).

Em estudos recentes, o uso da quimioterapia combinada tem sido questionado quanto ao seu custo-benefício, já que, a combinação não isenta a toxicidade do tratamento e em alguns casos, não promove melhorias na sobrevida geral, no entanto, esse ainda é um assunto bastante discutido (JARDIM et al., 2020; ZER et al., 2018).

Além da toxicidade, outro fator impactante da quimioterapia é a resistência a medicamentos que reduz a eficácia tanto da quimioterapia convencional quanto da terapia-alvo. O câncer pode adquirir resistência após exposição ao quimioterápico, que a princípio responde ao tratamento, no entanto, ao decorrer do tempo torna-se insensível a medicamentos semelhantes. Aproximadamente 80-90% das mortes de pacientes com câncer está direta ou

indiretamente ligada ao surgimento de células multidrogas resistentes (MDR) (YUAN et al., 2017).

Devido aos obstáculos enfrentados com a utilização de quimioterápicos citotóxicos, a busca por substâncias extraídas ou isoladas de produtos naturais têm sido uma alternativa extensivamente explorada, em especial, produtos de origem vegetal que há séculos vem sendo utilizados tradicionalmente para tratamento de diferentes doenças.

No início deste século, com o surgimento de novas tecnologias em química combinatórias e triagem de alto rendimento, se imaginou que o futuro da quimioterapia fosse regido pela produção de drogas sintéticas, em detrimento dos produtos naturais que foram base da quimioterapia durante décadas (JOHN, 2002). No entanto, o que se viu ao passar dos anos foi um aumento crescente nas pesquisas de produtos naturais em diversos tipos de câncer (ZHANG et al., 2020).

As plantas medicinais têm se mostrado uma fonte rica em compostos bioativos e recentemente tem se registrado aumento nas descobertas e isolamento desses compostos (alcaloides, terpenos, poliésteres macrocíclicos, proteínas, etc.) validando o uso de plantas e o conhecimento tradicional (LICHOTA; GWOZDZINSKI, 2018). Alguns exemplos de agentes quimioterápicos, paclitaxel e vincristina, foram inicialmente isolados das plantas *Taxus brevifolia* e *Catharanthus roseus*, respectivamente.

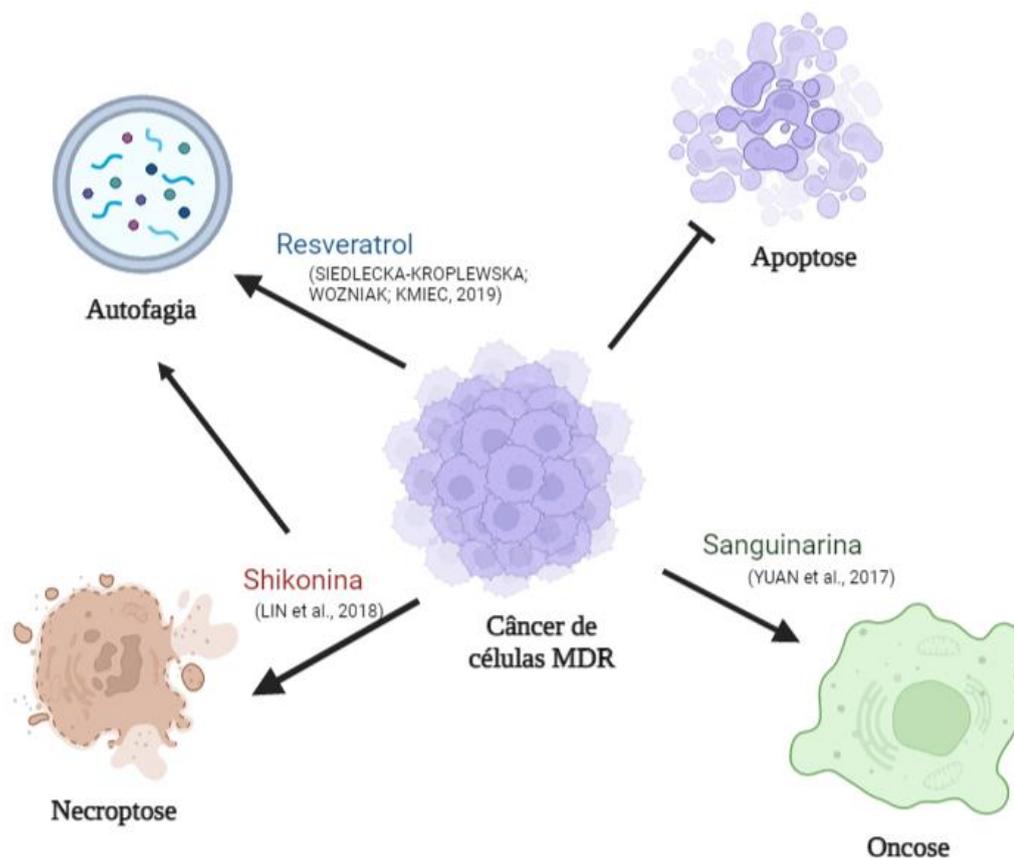
Produtos naturais também podem ser utilizados para melhorar a eficácia dos quimioterápicos citotóxicos, seja por mitigação da toxicidade e/ou maximização da citotoxicidade às células tumorais. Por exemplo, o ácido elágico e o monoterpeneo cineol, conferem hepato e cardioproteção contra a toxicidade provocada por ciclofosfamida (ABDALLAH et al., 2019).

As células tumorais MDR conseguem escapar da morte celular inibindo as vias de ativação da apoptose, a principal via de morte dos quimioterápicos citotóxicos (YUAN et al., 2017). Em vista disso, alguns exemplos de produtos naturais já foram reportados para contornam a MDR por induzirem morte celular não-apoptótica (Figura 6), como o resveratrol, um polifenol estilbeno encontrado em várias plantas incluindo uvas e amendoins, induz a morte celular mediada por autofagia em linhagens de leucemias humana (SIEDLECKA-KROPLEWSKA; WOZNIAK; KMIEC, 2019).

A shikonina, uma naftoquinona de origem natural, pode provocar necroptose mediada por RIPK1/3 em células de câncer de mama murino, decorrente de autofagia iniciada por estresse oxidativo (LIN et al., 2018). Outro exemplo, a sanguinarina um alcalóide isolado da

família Papaveraceae, foi citado por induzir ao menos três vias de morte celular apoptose, autofagia e oncose em células tumorais (YUAN et al., 2017).

Figura 6 – Exemplos de produtos naturais que induzem morte celular não-apoptótica.



Fonte: o autor (2022). Imagem foi criada como o BioRender.

3.4 TERPENOS

Os terpenos representam a maioria dos componentes identificados em óleos essenciais, com predominância de mono e sesquiterpenos, compreendem uma classe diversificada de compostos orgânicos que exibem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória (MARQUES et al., 2019), antinociceptiva (GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014; JANSEN et al., 2019), inseticida (ANDRADE-OCHOA et al., 2018), atividade antiviral (SANDARGO et al., 2019; YAMASHITA et al., 2017), ação antimicrobiana (BADAWY et al., 2019; SHIH et al., 2013), atividade antioxidante (GOUDA et al., 2017; SHARIFI-RAD et al., 2018) e atividade anticâncer para diversas linhagens de

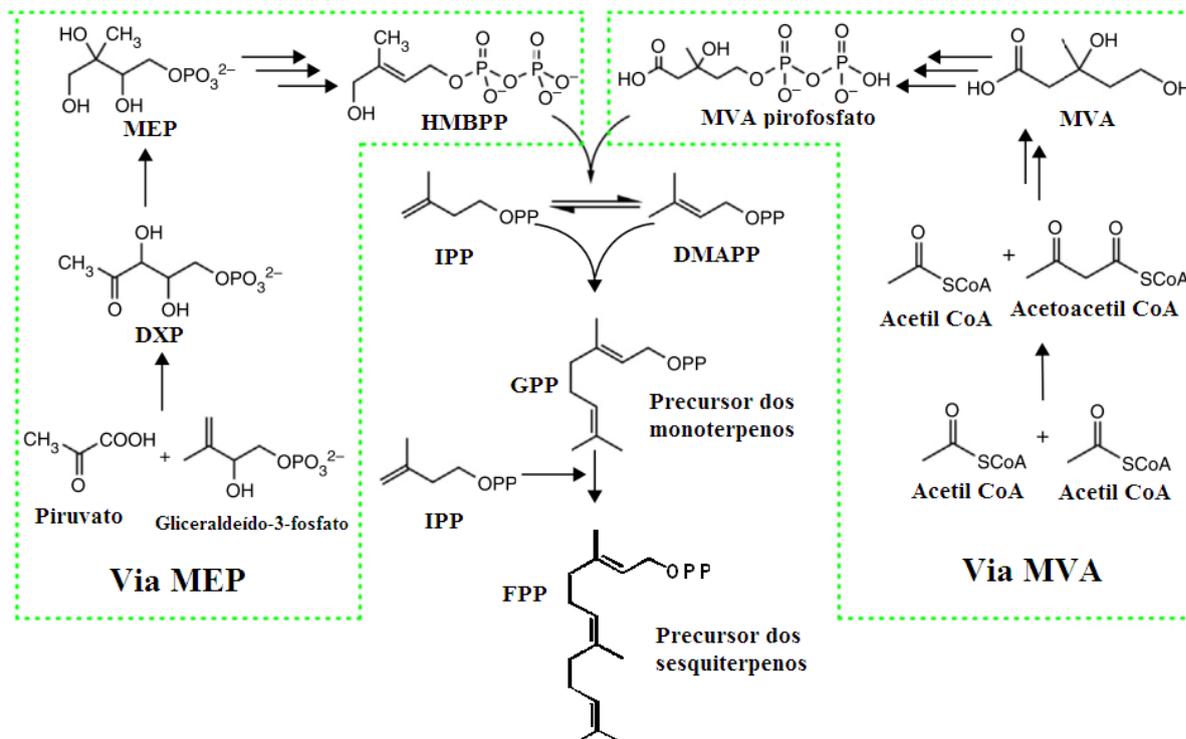
células tumorais (AYDIN; TÜRKEZ; KELEŞ, 2015; DING; CHEN, 2018).

Terpenos são geralmente constituídos apenas por hidrocarbonetos, no entanto, radicais como álcoois, aldeídos ou cetonas, também podem estar presentes, nesse caso, são denominados terpenóides. Podem ser classificados de acordo com o número de unidades básicas de 5 carbonos (isoprenos); hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e politerpenos (>C₃₀) (BRAHMKSHATRIYA; BRAHMKSHATRIYA, 2013).

Existem duas vias principais para a biossíntese dos terpenos: a via do mevalonato (MVA) e a via do metileritriol-4-fosfato (MEP) ou 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) (Figura 6). Em todos os eucariotos a biossíntese dos terpenos é realizada via VMA no citosol e nas mitocôndrias, nos procariotos a síntese é realizada via MEP, já nas plantas as duas vias são utilizadas (BRAHMKSHATRIYA; BRAHMKSHATRIYA, 2013; KIRBY et al., 2016).

Ambas as vias produzem os intermediários de cinco carbonos, isopentenil pirofosfato (IPP) e sua forma isomérica dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que são os precursores de isoprenos, unidade básica de todos os terpenos. Basicamente, uma unidade de IPP é adicionada a uma unidade de DMAPP formando geranyl pirofosfato (GPP), com 10 carbonos, são os precursores dos monoterpenos. Quando adicionado mais outra unidade de IPP ao GPP é formado farnesil pirofosfato (FPP) precursor dos sesquiterpenos, com 15 carbonos (Figura 7). A ação de uma série de enzimas catalisadoras (hidrolases, desidrogenases, redutases e glicosil, metil e acil transferases) confere a essas classes de compostos uma grande diversidade estrutural (BRAHMKSHATRIYA; BRAHMKSHATRIYA, 2013; REILING et al., 2004; ZEBEC et al., 2016).

Figura 7 - Biossíntese dos terpenos: via metileritriol-4-fosfato (MEP) e mevalonato (MVA).



Fonte: (ZEBEC et al., 2016). **HMBPP:** 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-pirofosfato.

A volatilidade e o odor agradável são características dos terpenos, e por este motivo essa classe de metabólitos secundários desperta grande interesse na indústria de alimentos, perfumaria e cosméticos sendo utilizado como sabores, fragrâncias e aditivos alimentares (ABDALLAH; QUAX, 2017; GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014), além disso, a ampla variedade estrutural confere aos terpenos alta versatilidade medicinal, tendo como exemplos clássicos o Taxol® (paclitaxel, um quimioterápico de primeira ou segunda linha para os cânceres de ovário, mama, pulmão de células não pequenas e Sarcoma de Kaposi) e a artemisinina, o principal fármaco antimalárico (BOUTANAIEV et al., 2015).

3.4.1 Nerolidol, um sesquiterpeno promissor

O nerolidol é um álcool sesquiterpeno de ocorrência abrangente em óleos essenciais de muitas espécies vegetais, como jasmim, gengibre e capim-limão, onde desempenha papel ativo na defesa contra herbívoros. É encontrado na forma isomérica, *cis* e *trans*-nerolidol e possui alta lipofilicidade, característica comum entre os terpenos, o que lhe confere uma maior facilidade em permear a membrana plasmática e interagir com alvos intracelulares (CHAN et al., 2016).

Além disso, o nerolidol pode ser isolado de produtos naturais ou sintetizado e apresenta baixa toxicidade, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) americana para aplicação industrial, como aditivo em alimentos e fragrância em produtos de perfumaria (SILVA et al., 2017).

Devido às características supracitadas o nerolidol tem atraído bastante atenção da comunidade científica, e a este vem sendo atribuído diversas atividades biológicas, por exemplo, antiparasitária, contra os agentes etiológicos das seguintes doenças (malária, tripanossomíase, esquistossomose, leishmaniose (CHAN et al., 2016), antifúngica (BEZERRA et al., 2020), anti-inflamatória (RAJ et al., 2020), antioxidante, antibacteriana (DE MOURA et al., 2021) e antitumoral (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI₅₀) do nerolidol em diferentes linhagens de células tumorais.

Composto	CI ₅₀	Tempo de tratamento	Linhagem celular	Referência
<i>Trans</i> -nerolidol, purificado de <i>Zornia brasiliensis</i>	21,99 e 17,58 µg/mL	72 h	Leucemia promielocítica humana (HL-60) e leucemia mielocítica crônica humana (K562), respectivamente.	(COSTA et al., 2015)
	41 e 35 µg/mL	72 h	Câncer de mama humano MDA-MB-231 e MCF-7 , respectivamente.	(HANUŠOVÁ et al., 2017)
<i>Trans</i> -nerolidol	28,7 µg/mL	72 h	Adenocarcinoma epitelial colorretal humano (CaCo-2)	(AMBROŽ et al., 2019)
	6,4 e 5,8 µg/mL	48 h	Carcinoma de pulmão humano (A-549) e adenocarcinoma de cólon humano (DLD-1), respectivamente.	(SYLVESTRE et al., 2007)
<i>Trans</i> -nerolidol	216,8 µM	48 h	Leiomioma de rato (ELT3).	(DONG; CHANG; CHEN, 2021)
<i>Cis</i> -nerolidol	172,9 µM			
Nerolidol não especificado	26,3 e 27,1 µM	48 h	MDA-MB-231 e MDA-MB-231 resistente a paclitaxel, nesta ordem.	(TOMKO et al., 2021)
<i>Cis</i> -nerolidol	16,5 µM	24 h	Carcinoma cervical humano (HeLa).	(BORIS et al., 2011)

Fonte: o autor (2022).

O nerolidol pode potencializar o efeito citotóxico de agentes quimioterápicos. Tendo como exemplo o *trans*-nerolidol que potencializou ação citotóxica da doxorubicina na linhagem tumoral CaCo-2 (AMBROŽ et al., 2019) e de forma semelhante, aumentou a ação da doxorubicina na linhagem MDA-MB-231 (HANUŠOVÁ et al., 2017).

O nerolidol também pode conferir proteção contra a toxicidade promovida por quimioterápicos. Em estudos conduzidos por Iqbal e colaboradores o nerolidol demonstrou

potencial cardioprotetor (IQUBAL et al., 2019a), neuroprotetor (IQUBAL et al., 2019b), mieloprotetor e hematoprotetor (IQUBAL et al., 2020) contra a toxicidade induzida por ciclofosfamida. Em outro estudo, o nerolidol, conferiu proteção contra cardiotoxicidade aguda e crônica induzida pela doxorrubicina (ARUNACHALAM et al., 2021; MEERAN et al., 2021).

Além disso, mecanismos de ação já foram definidos para algumas linhagens celulares. Por exemplo, o *cis*-nerolidol induz estresse do retículo endoplasmático decorrente de oxidação de CYP2C19 e CYP1A2 em células de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A (BIAZI et al., 2017). Já, na linhagem celular, de leiomioma (ELT3) *cis* ou *trans*-nerolidol (25 – 100 μ M) provoca inativação da via ATM/Akt, parada do ciclo celular em G1, geração de EROs e danos ao DNA (DONG; CHANG; CHEN, 2021).

Estudos *in vivo* apontam que o nerolidol possui baixo risco de toxicidade. A dose letal mediana (DL_{50}) do nerolidol, em camundongos, é de aproximadamente 10 g/kg, enquanto em ratos > 5 g/kg, dose única, por via oral (v.o.) (LAPCZYNSKI et al., 2008). Ainda, a concentração máxima de nerolidol no plasma sanguíneo de camundongos é de apenas 0,35 μ g/mL, após administração v.o. de 1 g/kg (SAITO et al., 2015), bem inferior à concentração efetiva de 50% (CE_{50}) hemolítica de 511,45 μ g/mL (MENDANHA et al., 2013).

Além de tudo que já foi descrito, o nerolidol é um composto de baixo custo em relação aos quimioterápicos padrões. A saber, 25 g de nerolidol custa R\$ 445,00, enquanto paclitaxel 25 mg custa R\$ 4.553,00, doxorrubicina 10 mg (R\$ 1.717,00) e ciclofosfamida 1 g (R\$ 629,00) (MERCK, 2021).

3.5 DOCKING MOLECULAR

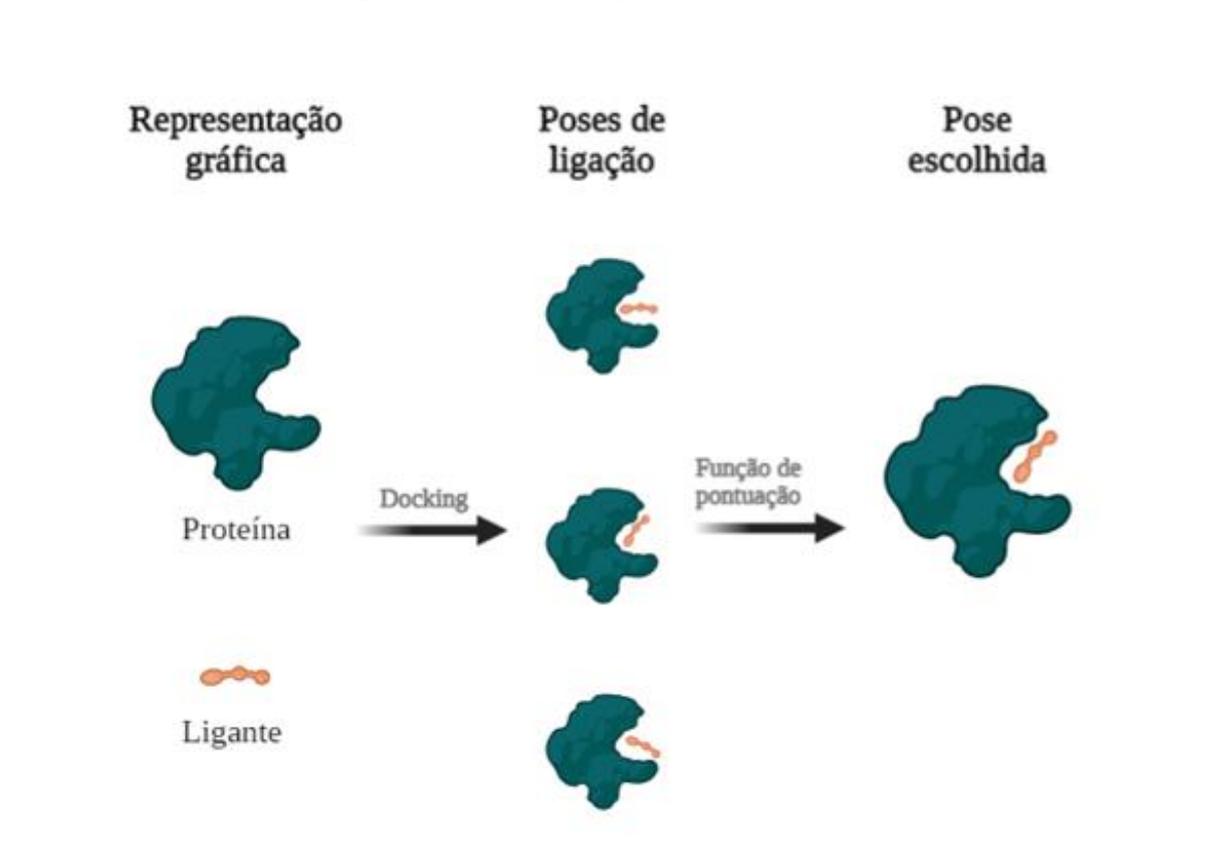
O *docking* molecular é um método computacional que tem por objetivo analisar a conformação e orientação (pose) de pequenas moléculas no local de ligação de um alvo macromolecular. É de grande importância para área farmacológica, pela capacidade de avaliar e quantificar a afinidade de uma molécula com o alvo de interesse, assim, possibilitando que um número maior de moléculas possam ser rastreadas, quanto a sua atividade biológica, nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos (GUPTA; SHARMA; KUMAR, 2018).

Este método computacional auxilia na descoberta de novos medicamentos exercendo tarefas nas diferentes etapas de processamento (identificação e otimização de *hits* ou substância ativa, reposicionamento de medicamentos já aprovados, identificação de alvos a

posteriori e identificação de alvos múltiplos). Para isso, vários softwares foram desenvolvidos ao longo dos anos como, DOCK, AutoDock, AutoDock Vina, GOLD, FlexX (JIAO et al., 2021), que, são disponibilizados em sua maioria em servidores baseados na internet ou em pacotes de fácil *download* para a comunidade científica.

Programas de *docking* molecular desenvolvidos para análise proteína-ligante executam as tarefas através de três funções principais, inicialmente, é gerada uma representação computacional da proteína e do ligante, em seguida, é rodado um algoritmo de busca implementado nos pacotes de *docking* responsável por analisar e gerar possíveis poses de ligação e por fim, a função de pontuação que visa qualificar e quantificar as poses de ligação calculadas (Figura 8) (TEMML; KUTIL, 2021).

Figura 8 – Fases de execução do *docking* molecular.



Fonte: o autor (2022). Imagem foi criada como o BioRender.

No passado os programas de *docking* molecular não consideravam a flexibilidade molecular, ou seja, tanto as proteínas quanto os ligantes eram rígidos (*docking* rígido), atualmente os *softwares* utilizam método de *docking* flexível onde os ligantes têm sua conformação testada de acordo com os graus de liberdade conformacional no sítio de ligação das proteínas, em alguns softwares mais robustos a proteína também tem certo grau de

flexibilidade, onde, aminoácidos individuais podem assumir diferentes orientações (TEMML; KUTIL, 2021).

Algoritmos de *docking* flexível podem ser divididos em dois métodos, o primeiro, método baseado em energia onde é representada a energia livre de ligação como uma função da geometria de ligações e o segundo, método estocástico que funciona alterando aleatoriamente os graus de liberdade de translação, rotação e torção de uma molécula (TEMML; KUTIL, 2021).

Para avaliar a qualidade das poses de ligação, os programas de *docking* molecular utilizam a função de pontuação (*Scoring Function* – SF), essa função permite avaliar entre as inúmeras poses geradas, a melhor conformação do ligante, o local de ligação e as possíveis interações entre o ligante e a proteína alvo. De acordo com o princípio de avaliação os SFs podem ser classificados em três categorias principais: baseado na física, empírico e baseado em conhecimento (LI; FU; ZHANG, 2019).

Os SFs baseados na física consistem no somatório das energias de várias interações não-covalentes (van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas) de um campo de força. É indicado para calcular a energia livre do complexo proteína-ligante, apresentando maior poder preditivo em comparação com os outros SFs, no entanto, quando incorporados termos de entalpia, entropia e solvatação, que são simplificados ou negligenciados nos SFs baseados em campo de força convencionais (LI; FU; ZHANG, 2019; SHEN et al., 2020).

Funções de pontuação empíricas são baseadas na análise de afinidade entre estruturas obtidas experimentalmente, funciona através de análise de regressão usando dados de afinidade de complexos conhecidos de proteína-ligante (GUEDES; PEREIRA; DARDENNE, 2018). Funções de pontuação baseados em conhecimento utilizam dados provenientes de complexos cristalográficos entre ligantes e proteínas, como uma base de conhecimento, para calcular a estatística dos potências contatos entre pares de átomos (SHEN et al., 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigos.

4.1 ARTIGO 1 - ESTUDOS IN VITRO E IN SILICO DE TERPENÓIDES NATURAIS EM LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER HUMANO

Estudos *in vitro* e *in silico* de terpenóides naturais em linhagens de células de câncer humano

Bruno I. M. Silva^a, Bruno O. Veras^b, Natanael F. Alencar^a, Teresinha G. Silva^a, Jaciana S. Aguiar^{a,*}

^a Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil

***Corresponding author**

Jaciana dos Santos Aguiar, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brasil

Tel.: +55 081 9 9604-4192

E-mail address: jaciana.aguiar.ufpe.br

Abstract

Background: A quimioterapia é o procedimento mais utilizado no tratamento do câncer, embora, a citotoxicidade seja inerente aos quimioterápicos que também causam danos as células normais. Nesse contexto, a prospecção por fármacos anticâncer com menor toxicidade se faz necessária, a classe dos terpenos representa uma alternativa no combate ao câncer, pois, alguns dos compostos dessa classe já foram descritos como efetivos antitumorais com baixa toxicidade.

Purpose: Neste trabalho, foi avaliado a citotoxicidade de 17 terpenos, mono e sesquiterpenos, em linhagens de células tumorais humanas e dos compostos que demonstraram melhor atividade foi feito o estudo de docking molecular em proteínas associadas ao câncer.

Methods: Para isso, foi realizado um *screening* inicial dos 17 terpenos pelo ensaio do MTT, onde os compostos foram avaliados quanto ao percentual de inibição celular (IC%), os mais ativos tiveram sua concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI₅₀) determinados, além disso, foi avaliado a capacidade hemolisante em eritrócitos murinos e os efeitos na morfologia celular e na formação de colônias de células HeLa, juntamente com os estudos de docking molecular nos alvos celulares p53, Bcl2-xL, tubulina e DNA.

Results: Os seguintes compostos α -pineno, (+)-valenceno, β -cariofileno, (-)- α -copaeno e nerolidol apresentaram inibição acima de 80 % para mais de uma linhagem celular ou foram específicos para as linhagens tumorais. Os valores de CI₅₀ obtidos variaram de 13,28 a 19,60 μ g/mL. O nerolidol mostrou especificidade para as linhagens tumorais MCF-7 e HeLa, apresentando valores de CI₅₀ de 17,63 e 13,50 μ g/mL, respectivamente. Em células HeLa, o nerolidol causou a formação de vacúolos e núcleos condensados com redução progressiva das células viáveis, também reduziu significativamente a formação de colônia dessas células. O

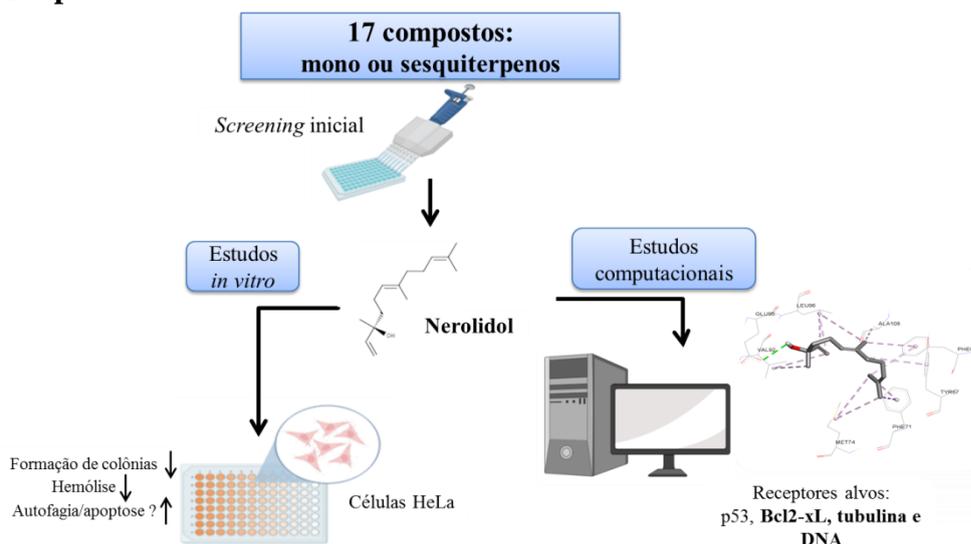
nerolidol parece ser seguro até a concentração de 39 $\mu\text{g/mL}$ uma vez que causou apenas 2,7 % de hemólise e apresentou valor de concentração efetiva de 50% (CE_{50}) alta de 736,8 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, mostrou melhores resultados de ancoragem para os receptores Bcl2-xL, tubulina e fragmento de DNA, realizando ligações de hidrogênio com os mesmos.

Conclusions: O nerolidol possui propriedades antitumorais, com indícios que apontam morte por autofagia e/ou apoptose. Este estudo é o primeiro passo para elucidar o mecanismo de morte celular provocado por este sesquiterpenóide.

Palavras-chaves: citotoxicidade; sesquiterpenóides; anticâncer; apoptose; cultura de células

Abreviações: CE_{50} , Concentração efetiva de 50%; IC%, Percentual de inibição celular; CI_{50} , Concentração que inibe 50% do crescimento celular; FDA, *Food and drug administration*; EROs, Espécies reativas de oxigênio; MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo; IS, Índice de seletividade; PDB, *Protein data bank*; ADT, software AutoDockTools; RMSD, *Root mean square deviations*; EPM, Erro padrão médio; IC 95%, Intervalo de confiança de 95%.

Graphical abstract



Introdução

A incidência e mortalidade por câncer vêm crescendo rapidamente pelo mundo, atualmente, representa uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável pela morte de aproximadamente 10 milhões de pessoas, em 2020 (Sung et al., 2021). A quimioterapia é um dos principais tratamentos para pacientes com câncer, no entanto, a sua prática está relacionada a efeitos adversos, que pode variar entre sintomas leves como fadiga, queda de cabelo, diarreia ou constipação e em casos mais graves mielossupressão e toxicidade a órgãos como rins e coração (Ma et al., 2020). Apesar dos esforços no desenvolvimento de quimioterápicos eficazes, os efeitos colaterais graves e o desenvolvimento de resistência a medicamentos ainda são os principais obstáculos no tratamento efetivo do câncer (Shrestha et al., 2016).

Os obstáculos no uso da quimioterapia e a incidência crescente de câncer no mundo tem impulsionado a busca por novos medicamentos anticâncer derivados de produtos naturais, principalmente, de plantas que já são utilizadas há séculos tradicionalmente para tratamento de doenças. As plantas medicinais têm se mostrado uma fonte rica em compostos bioativos e recentemente foi registrado aumento nas descobertas e isolamento desses compostos (alcaloides, terpenos, poliésteres macrocíclicos, proteínas, etc.) validando o uso de plantas e o conhecimento tradicional (Lichota and Gwozdzinski, 2018).

Os terpenos são maioria entre os compostos identificados em óleos essenciais, geralmente mono e sesquiterpenos. Exibem uma variedade de atividades biológicas e inclusive já ocupam lugar de destaque entre os fármacos, como, por exemplo, o diterpeno paclitaxel (Taxol®, quimioterápico de primeira ou segunda linha para os cânceres de ovário, mama, pulmão de células não pequenas e Sarcoma de Kaposi) e o sesquiterpeno artemisinina, o principal fármaco antimalárico (Boutanaev et al., 2015). Pertencente à classe dos terpenos, o sesquiterpeno alcoólico nerolidol está presente em óleos essenciais de muitas espécies vegetais, onde desempenha papel ativo na defesa dessas plantas (Chan et al., 2016), além disso, pode ser sintetizado e apresenta baixa toxicidade, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para aplicação industrial, como aditivo em alimentos e fragrância em cosméticos (Silva et al., 2017).

Ao nerolidol vem sendo relatado diversas atividades biológicas, por exemplo, antiparasitária, (Chan et al., 2016); antifúngica (Bezerra et al., 2020); cardioprotetora (Asaikumar et al., 2019); anti-inflamatória (Raj et al., 2020); antioxidante e antibacteriana (de Moura et al., 2021). Dentre as atividades biológicas as propriedades antitumorais do nerolidol se destacam, por já estarem bem descritas para algumas linhagens tumorais. O cis-nerolidol apresenta citotoxicidade em células HepG2/C3A através da oxidação de CYP2C19 e CYP1A2, provocando estresse do retículo endoplasmático (Biazi et al., 2017). Já, na linhagem celular, de leiomioma (ELT3) cis ou trans-nerolidol induzem parada do ciclo celular em G1 por meio de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), danos ao DNA e inativação da via ATM/Akt (Dong et al., 2021).

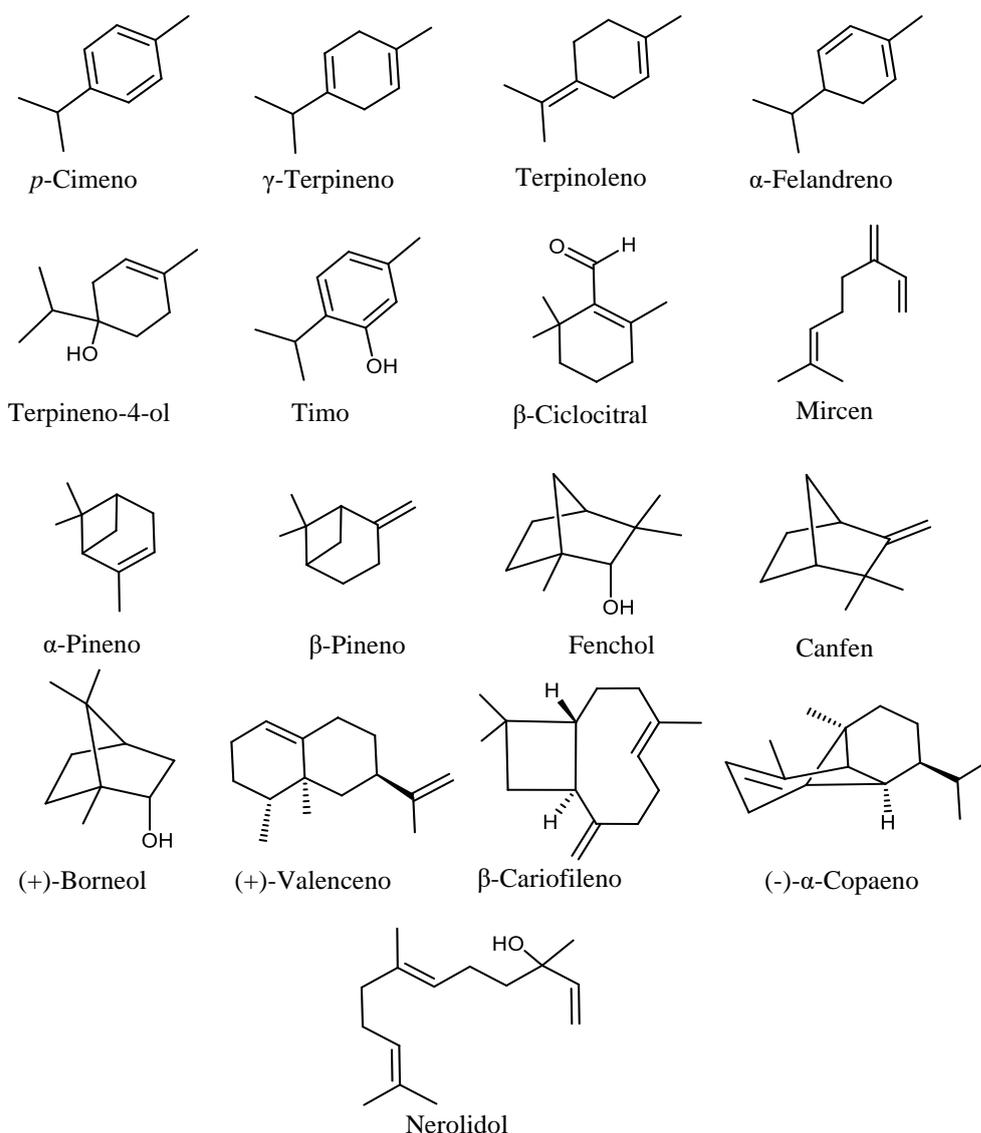
Diante do disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar um painel de 17 terpenos, mono e sesquiterpenos, quanto a sua atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais humanas. E selecionar o composto mais efetivo para os estudos de docking molecular em receptores associados ao câncer.

Material e métodos

Compostos

Os compostos utilizados neste trabalho (Fig. 1), monoterpenos: *p*-cimeno (99%), γ -terpineno ($\geq 95\%$), terpinoleno ($\geq 90\%$), α -felandreno ($\geq 85\%$), terpineno-4-ol ($\geq 95\%$), timol ($\geq 98\%$), β -ciclocitral ($\geq 95\%$), mirceno ($\geq 90\%$), α -pineno (98%), β -pineno ($\geq 97\%$), fenchol ($\geq 96\%$), canfeno (95%), (+)-borneol ($\geq 97\%$) e sesquiterpenos: (+)-valenceno ($\geq 70\%$), β -cariofileno ($\geq 80\%$), (-)- α -copaeno ($\geq 90\%$), nerolidol, mistura de *cis* e *trans* (98%) foram adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Mo, USA).

Fig. 1. Estrutura química dos compostos terpenóides.



Fonte: O autor (2022).

Animais

Foram utilizados camundongos albinos *swiss*, fêmeas, com idade entre 5 e 6 semanas, pesando entre 20 e 25 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e mantidos em alojamento

convencional a 23 ± 2 °C com um ciclo claro/escuro controlado de 12 horas e água mineral e ração para roedores (Muvilab) *ad libitum*. O ensaio com animais somente foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE, processo n° 002/2021.

Cultura de células

Foram utilizadas seguintes linhagens de células tumorais humanas; adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma epidermóide cervical (HeLa), adenocarcinoma de cólon (HT-29), carcinoma colorretal (HCT-116) e linhagem não tumoral; fibroblastos de camundongo (L929), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE. Todas as linhagens foram mantidas em meio DMEM ou RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino e 1% de antibióticos (penicilina 1000 IU/mL e estreptomicina 250 µg/mL) a 37 °C, 5% de CO₂ e atmosfera umidificada.

Ensaio de citotoxicidade

As linhagens celulares (10^5 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 h, os compostos dissolvidos em dimetilsulfoxido 0,5% (DMSO) foram adicionados aos poços na concentração final de 25 µg/mL. O paclitaxel (30 µg/mL) foi utilizado como controle positivo. Após período de tratamento 72 h, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e as placas reincubadas por 2 h, em seguida, o meio de cultura foi aspirado e os cristais de formazan solubilizados em DMSO (MOSMANN et al., 1983). A absorbância foi medida em espectrofotômetro de placas no comprimento de onda de 560 nm.

Apenas para os compostos que apresentaram percentual de inibição do crescimento celular (IC%) $\geq 75\%$ em duas ou mais linhagens tumorais, foram determinadas as concentrações que inibe 50% do crescimento celular (CI₅₀), foram avaliados os terpenos nas concentrações de 0,20 – 25 µg/mL e o paclitaxel (0,23 – 30 µg/mL). O ensaio do MTT foi repetido em períodos de incubação menores, 24 e 48 h, com o composto que obteve melhores resultados, para determinação da CI₅₀ que foi base para o ensaio morfológico.

Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) também foi calculado para comparar a seletividade dos compostos menos tóxicos entre os mais ativos. O SI foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{IS} = \text{Valor de CI}_{50} \text{ da linhagem não tumoral} / \text{Valor de CI}_{50} \text{ da linhagem tumoral} \times 100$$

O valor IS acima de 100 indica que o efeito citotóxico da substância testada é maior nas linhagens de células tumorais em relação à linhagem não tumoral. O valor de IS igual a 100 ou inferior sugere que a concentração do composto para atingir o efeito terapêutico é semelhante ou inferior à concentração que causa efeitos tóxicos (POPIOŁKIEWICZ et al., 2005).

Ensaio hemolítico

Para avaliar o potencial hemolítico o sangue de camundongos foi coletado e

centrifugado (3000 rpm/ 5 min), os eritrócitos foram diluídos em solução salina obtendo uma suspensão de eritrócitos a 2%. O nerolidol diluído em DMSO 0,5% foi adicionado em concentrações seriadas (20-2500 µg/mL) e o Triton X – 100 a 1% utilizado como controle positivo. Após 2 h de incubação, em temperatura ambiente, o sobrenadante foi recuperado e a hemoglobina liberada mensurada em espectrofotômetro de placas no comprimento de onda de 540 nm.

Estudo de morfologia celular

As células HeLa foram plaqueadas (10^5 células/mL) em placas 24 poços e expostas ao nerolidol em diferentes concentrações (30, 15 e 7,5 µg/mL), por 48 h. Após período de incubação as células foram coradas com panótico rápido, seguindo as instruções do fabricante (LABORCLIN – Produtos para laboratórios LTDA), resumidamente, as células foram imersas em uma solução fixadora seguida por duas outras soluções corantes, por 5 segundos cada. Após a secagem as células foram analisadas em microscópio óptico e as alterações registradas por fotografia.

Ensaio de formação de colônias

As células HeLa foram cultivadas em placas de 12 poços (500 células/poço) e, em seguida, tratadas com nerolidol em diferentes concentrações 15, 7,5 e 3,75 µg/mL. O meio de cultura contendo nerolidol foi substituído a cada 3 dias, durante 15 dias. Para testar se o efeito do nerolidol é reversível, algumas células foram tratadas apenas por 72 h, e feitas as substituições a cada 3 dias apenas com meio de cultura, até o termino de 15 dias. Após período de incubação, as células foram coradas com panótico rápido, e as colônias foram contadas e registradas por fotografia em microscópio de luz invertido. Apenas colônias com número de células > 20 foram contabilizadas.

Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo software GraphPadPrism 6.0. Diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de *Tukey* ou *Bonferroni*. O nível de $p < 0,05$ foi usado para definir diferenças significativas. Os resultados citotóxicos foram expressos em CI_{50} e a hemólise expressa em CE_{50} .

Análise computacional

Preparação das estruturas dos receptores e ligantes

As estruturas dos receptores foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB). Foram escolhidas estruturas associadas à progressão tumoral e a apoptose celular, p53 (PDB 1T4F), Bcl2-xL (PDB 2W3L), tubulina (PDB 1SA0) e um fragmento de DNA (PDB 1BNA). Todas as estruturas foram determinadas experimentalmente por Difração de Raios-X.

As estruturas cristalográficas dos receptores obtidas no PDB, foram preparadas utilizando o software AutoDockTools (ADT) versão 1.5.6. No ADT foram adicionados hidrogênios polares às estruturas, além disso, foram removidos moléculas de águas e outros

ligantes co-cristalizados, logo após foram adicionados a cada receptor cargas de Kollman (Singh and Kollman, 1984). Os arquivos foram salvos no formato *.pdbqt*, formato requerido para o programa de *docking*, do mesmo grupo, AutoDock Vina versão 1.2.1.

Os ligantes selecionados para o *docking* molecular foram os terpenos que apresentaram melhores resultados no ensaio do MTT. As estruturas em 2D foram obtidas através do software MarvinSketch versão 20.20 e suas respectivas formas tridimensionais foram obtidas pelo software Avogadro versão 1.1.2.

Otimização geométrica das estruturas dos ligantes foi realizada, primeiro por mecânica molecular utilizando campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field) (Halgren, 1996), com 50 passos por atualização e algoritmo *Steepest Descent*, seguido de gradiente conjugado. Em seguida, foi gerado no Avogadro um *input* de cada ligante para otimização geométrica por mecânica quântica, utilizando o método semi-empírico.

O programa de química quântica utilizado foi o MOPAC2016. Os cálculos foram rodados a partir do terminal de comandos do Linux e os arquivos de *output* foram utilizados para obter informações energéticas e geométricas das estruturas dos ligantes otimizados por química quântica. Que em seguida, foram abertos no AutoDockTools e preparados para o *docking* molecular. No ADT foram adicionadas cargas de Gasteiger (Gasteiger and Marsili, 1978), mesclados os hidrogênios não polares e assinaladas às ligações rotacionáveis.

Re-docking

O *re-docking* foi utilizado com o objetivo de validar o protocolo de docking em reproduzir as estruturas obtidas experimentalmente por cristalográfica. Neste procedimento o ligante co-cristalizado é removido do receptor e realizado *docking* no seu receptor de origem, no final foi verificado se o cálculo de docking foi capaz de obter a pose semelhante ou igual ao experimental, para isso foi feita inspeção visual através do RMSD (*Root Mean Square Deviation*) utilizando o software PyMOL v. 2.4.1.

Docking molecular

O *docking* foi realizado com o AutoDock Vina, para cada receptor foi formado um arquivo de configuração *conf.txt* de input, contendo os parâmetros de tamanho e centro da *gridbox*, bem como o nome dos arquivos dos receptores e ligantes no formato *.pdbqt* na mesma pasta. Para cada receptor os parâmetros de tamanho e centro da *gridbox* foi feito de acordo com o ligante presente no seu sítio ativo ou resíduos de aminoácidos importantes para sua atividade, encontrados na literatura de referência de cada receptor, exceto para o DNA (PDB 1BNA) que foi usado a estrutura toda para a realização da ancoragem molecular.

As análises das interações entre os ligantes e os receptores foram feitas por inspeção visual 3D com o auxílio do PyMOL e os diagramas com as diferentes interações foi obtida usando o Discovery Studio Visualizer.

Resultados e discussão

Atividade citotóxica dos terpenos

De acordo com os resultados do ensaio do MTT o α -pineno foi o único monoterpeneo que apresentou citotoxicidade alta frente às linhagens celulares L929, HeLa e HT-29, os demais monoterpeneos apresentaram citotoxicidade intermediária ou fraca, em concordância com a escala de intensidade proposta por (Mahmoud et al., 2011), citotoxicidade baixa (IC% < 50%), citotoxicidade intermediária (IC% 51% – 75%) e citotoxicidade alta (IC% > 75%). Os sesquiterpenos, (+)-Valenceno, β -cariofileno, (-)- α -copaeno e nerolidol, tiveram melhor

desempenho, todos apresentaram alta atividade citotóxica no mínimo para uma linhagem tumoral. Nenhum dos compostos testados apresentaram citotoxicidade alta para a linhagem HCT-116. Os sesquiterpenos β -cariofileno e nerolidol apresentaram alta citotoxicidade apenas para as linhagens tumorais MCF-7 e HeLa, estes resultados estão melhor detalhados na Tabela 1.

Tabela 1

Valores de percentual de inibição celular (IC%) dos terpenos (25 μ g/mL) e paclitaxel (30 μ g/mL) frente linhagens de células tumorais e não tumoral (L929), após incubação de 72 h.

Compostos	Linhagens celulares e IC% \pm EPM				
	L929	MCF-7	HeLa	HT-29	HCT-116
<i>p</i> -Cimeno	5,53 \pm 1,41	0,00 \pm 0,00	13,20 \pm 1,47	16,24 \pm 0,00	10,32 \pm 1,91
γ -Terpineno	40,43 \pm 0,96	54,23 \pm 1,63	53,82 \pm 2,61	27,08 \pm 1,67	18,97 \pm 0,76
Terpinoleno	13,40 \pm 0,61	7,18 \pm 0,98	18,76 \pm 1,20	19,17 \pm 1,90	12,48 \pm 1,96
α -Felandreno	26,48 \pm 3,69	43,35 \pm 1,61	63,76 \pm 2,07	29,52 \pm 1,34	5,53 \pm 1,92
Terpinen-4-ol	15,54 \pm 1,94	8,99 \pm 0,00	9,96 \pm 1,79	6,59 \pm 1,44	6,19 \pm 1,72
Timol	15,60 \pm 1,24	11,22 \pm 2,08	15,22 \pm 1,91	28,16 \pm 4,52	20,90 \pm 3,33
β -Ciclocitral	23,87 \pm 0,47	23,57 \pm 0,25	18,42 \pm 1,39	17,90 \pm 2,71	8,16 \pm 2,30
Mirceno	63,85 \pm 2,02	58,81 \pm 3,47	22,30 \pm 1,75	49,42 \pm 2,65	12,97 \pm 0,92
α -Pineno	97,00 \pm 1,10	56,26 \pm 3,34	90,58 \pm 1,51	87,30 \pm 1,29	14,39 \pm 1,28
β -Pineno	72,16 \pm 0,00	6,61 \pm 2,03	42,65 \pm 0,39	59,25 \pm 2,30	16,65 \pm 0,28
Fenchol	28,50 \pm 1,44	13,04 \pm 0,62	6,12 \pm 0,44	5,67 \pm 1,37	6,79 \pm 0,78
Canfeno	21,25 \pm 2,15	9,70 \pm 0,53	31,45 \pm 1,65	40,46 \pm 1,88	16,26 \pm 1,72
(+)-Borneol	14,18 \pm 2,03	17,46 \pm 0,00	2,20 \pm 0,83	11,41 \pm 0,87	4,07 \pm 1,89
(+)-Valenceno	96,14 \pm 1,67	66,67 \pm 1,56	97,97 \pm 0,45	83,37 \pm 0,60	67,54 \pm 1,57
β -cariofileno	68,83 \pm 3,65	49,37 \pm 1,81	84,56 \pm 1,99	41,31 \pm 2,23	47,65 \pm 1,16
(-)- α -copaeno	80,80 \pm 3,04	73,02 \pm 1,37	96,43 \pm 0,42	85,40 \pm 1,41	60,42 \pm 2,23
Nerolidol	14,70 \pm 1,82	86,27 \pm 1,28	94,06 \pm 0,69	30,35 \pm 1,71	20,35 \pm 1,85
Paclitaxel	97,85 \pm 0,50	97,53 \pm 0,07	96,63 \pm 0,58	98,60 \pm 0,12	94,78 \pm 0,29

Fonte: O autor (2022). EPM: erro padrão médio. Paclitaxel (30 μ g/mL) foi utilizado como controle positivo.

Vale ressaltar que embora os monoterpênos não tenham apresentado alta atividade citotóxica, para as linhagens testadas, na concentração de 25 μ g/mL, isso não implica dizer que não sejam citotóxicos para células tumorais, haja vista, que alguns dos monoterpênos já foram testados em concentrações mais elevadas, em diferentes linhagens, e foi demonstrado serem compostos promissores (Silva et al., 2021), por exemplo, o **canfeno e timol** apresentaram valores de concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI₅₀) de 70 e 88 μ g/mL respectivamente, em células de melanoma murino B16-F10, nessa linhagem celular o canfeno induziu apoptose por via intrínseca e inibiu o crescimento tumoral, *in vivo*, de células B16F10 (10 mg/kg) em camundongos C57BL/6 (Girola et al., 2015). E o **4-terpineol** (25 - 100 μ M), de forma dose dependente, induziu apoptose, inibição da migração celular e bloqueio do ciclo celular na fase sub-G1 em células Hep-G2, também, causou diminuição do crescimento do xenoinxerto de células Hep-G2 em camundongos BALB-c nude, nas concentrações de 10 e 20 mg/kg (Liu et al., 2016).

Diante dos resultados o α -pineno e os sesquiterpenos tiveram os valores de CI_{50} determinados (**Tabela 2**). Todos compostos avaliados apresentaram valores de CI_{50} inferiores a 20 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com Bayala et al. (2018) compostos com valores de $CI_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$, em cultura de células, podem ser utilizados como quimioterápicos de combate ao câncer. Além disso, os menores valores de CI_{50} foram obtidos para células **HeLa**, mostrando maior sensibilidade dessa linhagem aos compostos testados.

Tabela 2Valores de CI_{50} dos terpenos e paclitaxel frente linhagens celulares, após incubação de 72 h.

Compostos	CI_{50} e IC 95% ($\mu\text{g/mL}$)			
	L929	MCF-7	HeLa	HT-29
α -Pineno	17,69		15,48	19,41
	13,58 – 23,03	>25	13,76 – 17,41	17,10 – 22,80
(+) -Valenceno	16,54		14,24	17,35
	13,87 – 19,86	>25	12,70 – 15,97	15,82 – 19,03
β -cariofileno	>25	>25	18,34	>25
			16,58 – 20,28	
(-)- α -Copaeno	19,34		13,28	19,60
	17,54 – 21,31	>25	12,24 – 14,41	17,64 – 21,79
Nerolidol	>25	17,63	13,50	>25
		15,88 – 19,57	10,89 – 16,75	
Paclitaxel	7,92	7,43	0,29	0,39
	6,72 – 9,33	6,06 – 9,11	0,19 – 0,44	0,24 – 0,63

Fonte: O autor (2022). Valores representam média de três experimentos independentes. **IC 95%**: Intervalo de confiança de 95%.

A toxicidade dos quimioterápicos para as células saudáveis é o maior obstáculo no tratamento do câncer, por isso, o Índice de Seletividade (IS) foi inserido como uma medida indireta de segurança que avalia a seletividade dos compostos testados em relação às células tumorais. O valor IS acima de 100 indica que o efeito citotóxico da substância testada é maior nas linhagens de células tumorais em relação à linhagem saudável (Popiołkiewicz et al., 2005).

Com base apenas nos valores de CI_{50} (**Tabela 2**), podemos inferir que apenas os compostos β -cariofileno e nerolidol apresentaram seletividade para células tumorais, no entanto, os valores de IS (**Tabela 3**) mostram que todos os compostos foram seletivos para linhagem celular HeLa exibindo valores superiores a 100, e o nerolidol para a linhagem MCF-7. Também, mesmo apresentando citotoxicidade para a linhagem celular L929, (-)- α -copaeno (IS = 145,63) ainda apresenta maior seletividade para células HeLa que o β -cariofileno (IS = 136,31). Entre os compostos testados o nerolidol apresentou o maior índice de seletividade para as células HeLa e, portanto, foi selecionado para os ensaios posteriores.

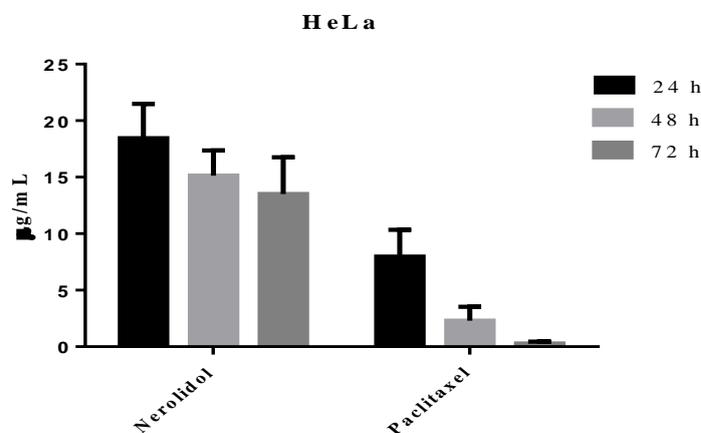
Tabela 3

Índice de Seletividade das linhagens tumorais contra linhagem não tumoral.

Compostos	Valores de IS		
	MCF-7	HeLa	HT-29
α -Pineno	-	114,27	91,14
(+)-Valenceno	-	116,15	95,33
β -cariofileno	-	136,31	-
(-)- α -Copaeno	-	145,63	98,67
Nerolidol	141,80	185,18	-
Paclitaxel	106,59	2731,03	2030,77

Fonte: O autor (2022).

No menor tempo de incubação o nerolidol apresentou valores de CI_{50} de 18,44 e 15,14 $\mu\text{g/mL}$ após 24 e 48 h, respectivamente, frente à linhagem celular HeLa. O paclitaxel exibiu valores de CI_{50} de 7,97 $\mu\text{g/mL}$ (24 h) e 2,31 $\mu\text{g/mL}$ (48 h) (**Fig. 2**). O valor de CI_{50} do nerolidol em 48 h, foi utilizado como referência para os ensaios de morfologia celular e formação de colônias.

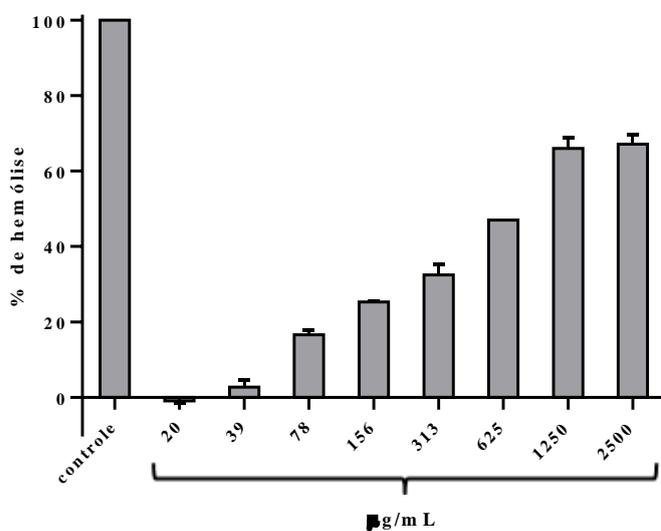
Fig. 2. Valores de CI_{50} do nerolidol e paclitaxel frente células HeLa, após incubação de 24, 48 e 72 h.

Fonte: O autor (2022).

Nerolidol é seguro para eritrócitos de camundongos

Os resultados da atividade hemolítica do nerolidol, em eritrócitos de camundongos, estão dispostos na **Fig. 3**. O nerolidol induziu hemólise nos eritrócitos de forma dose dependente, até o limite de 65-70% de hemólise, o valor da CE_{50} encontrado foi de 736,8 $\mu\text{g/mL}$.

Fig. 3. Percentual de hemólise do nerolidol, em eritrócitos murinos, após incubação de 2 h.



Fonte: O autor (2022).

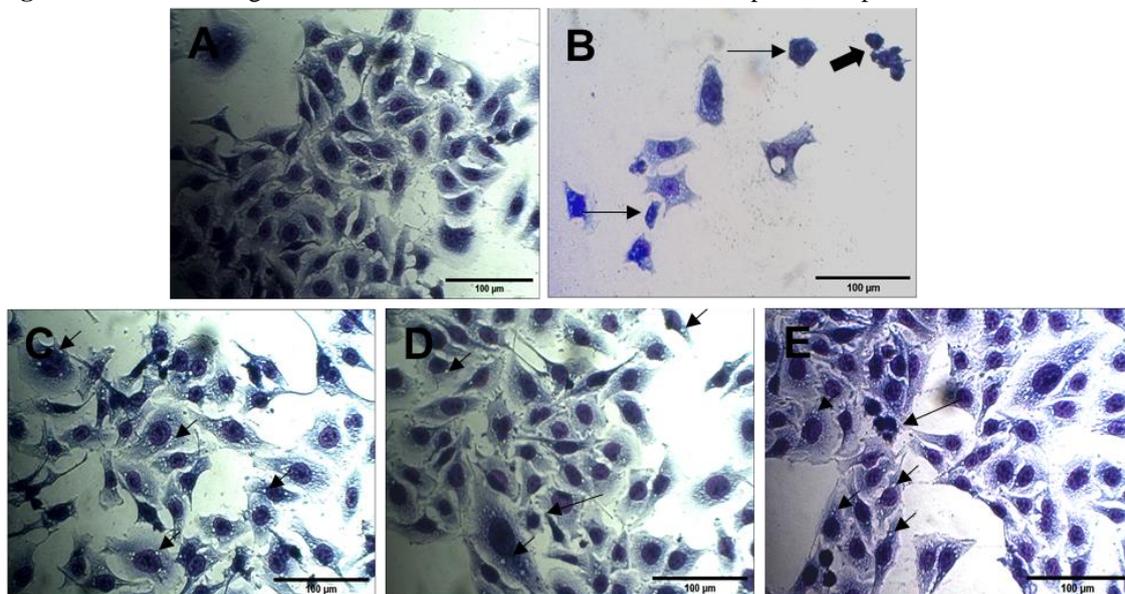
Mendalha et al. (2013) avaliaram a atividade hemolítica de diversos terpenos em eritrócitos humanos, entre eles o nerolidol com CE_{50} de 2,3 mM (511,45 µg/mL) após 1,5 h de incubação, corroborando com nossos resultados. Em estudo farmacocinético utilizando camundongos BALB/c, foi administrado por via oral 1000 mg/kg de nerolidol e foi constatado por análise de GC-MS pico máximo de nerolidol no plasma sanguíneo, após 6 h da administração, de aproximadamente $0,35 \pm 0,05$ µg/mL. Após 12 h, os níveis de nerolidol no sangue foi quase zerado (Saito et al., 2015). Esses dados farmacocinéticos mostram a baixa biodisponibilidade do nerolidol no plasma sanguíneo, concentração bastante inferior à CE_{50} hemolisante, corroborando com os achados neste trabalho e na literatura, onde nerolidol é seguro para eritrócitos de camundongos.

Nerolidol provoca alterações morfológicas na linhagem celular HeLa

As células HeLa tratadas com nerolidol apresentaram diminuição evidente do número de células viáveis, de forma dose dependente, à medida que a concentração aumentava. Também, apresentaram aumento na formação de vacúolos e células com núcleos picnóticos ou condensados (**Fig. 4 C, D e E**).

A formação de vacúolos é uma forte evidência de que o nerolidol esteja induzindo autofagia nas células HeLa, já os núcleos condensados são característicos de indução da apoptose. Em estudos anteriores, os monoterpenos mirtenal e α -trujone induziram o estresse oxidativo nas linhagens de células tumorais (B16F0, B16F10, SkMel-5 e T98G). Em resposta ao estresse oxidativo as células entraram em autofagia, e esta condição prolongada acarretou na apoptose dessas células (Martins et al., 2019; Pudełek et al., 2019). Possivelmente, neste trabalho, o nerolidol esteja atuando nas células HeLa dessa maneira.

Fig. 4. Análise morfológica de células HeLa, tratadas com nerolidol e paclitaxel por 48 h.



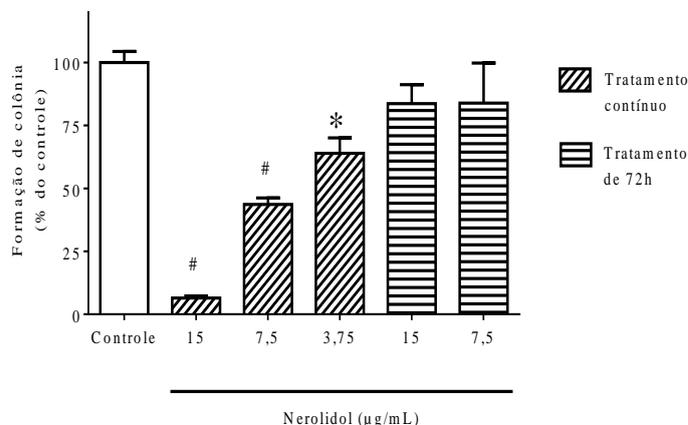
Fonte: O autor (2022). Aumento de 400 X. (A): controle negativo; (B): Células tratadas com paclitaxel 2,5 µg/ml; (C, D e E): Células tratadas com o nerolidol 30, 15 e 7,5 µg/ml, respectivamente. **Setas curtas:** formação de vacúolos; **Setas longas:** células com núcleos condensados ou picnóticos; **Setas cheias:** corpos apoptóticos contendo fragmentos nucleares.

Foram encontradas células com núcleos picnóticos e corpos apoptóticos como alterações morfológicas de células HeLa tratadas com o paclitaxel (**Fig. 4 B**). Células com núcleos picnóticos são caracterizadas por apresentarem cromatina condensada e redução do volume nuclear, o que faz com o núcleo apareça reduzido e hiper corado, este é um indício de apoptose. O paclitaxel já é bem descrito na literatura como fármaco antimitótico que age em células tumorais induzindo principalmente a morte celular por apoptose (Priyadarshini and Keerthi, 2012).

Nerolidol inibe a formação de colônias de células HeLa

Uma única célula tumoral retém a capacidade de crescer e formar colônias, podendo se tornar um novo tumor no local de metástase (Wei et al., 2019). Também referida como cronogenicidade, este teste é uma estimativa indireta da capacidade das células tumorais sofrerem transformações neoplásicas (Hsieh et al., 2005). Então, foi avaliado o efeito do nerolidol na formação de colônias de células HeLa. Nas células tratadas com nerolidol, foi observada inibição significativa na formação de colônias, de forma dose dependente, em 93,5, 56,0 e 36,0 % quando tratadas com nerolidol, de forma continuada, nas doses de 15, 7,5 e 3,75 µg/mL, respectivamente (**Fig. 5**). Além disso, foi observada a recuperação das células HeLa, após fim do tratamento de 72 h com nerolidol nas doses de 15,0 e 7,5 µg/mL (**Fig. 5**).

Fig. 5. Efeito do nerolidol no percentual de formação de colônias de células HeLa.



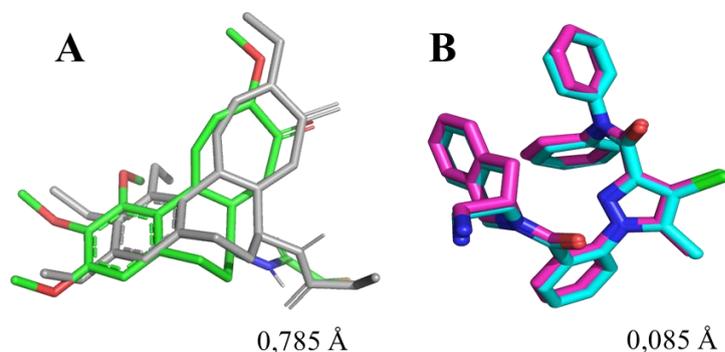
Fonte: O autor (2022). Os valores são expressos em média \pm erro padrão ($n = 4$ para cada grupo). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. Os símbolos indicam diferença significativa em relação ao controle, * $P < 0,01$ e # $P < 0,0001$.

Molecular docking

A metodologia de *docking* molecular explora o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação de uma proteína ou receptor-alvo, é cada vez mais usado como uma ferramenta na descoberta de novos medicamentos (Pagadala et al., 2017). Das estruturas cristalográficas utilizadas neste estudo apenas as proteínas tubulina (1SA0) e Bcl2-xL (2W3L) continham moléculas co-cristalizadas em suas estruturas. Por esse motivo apenas essas foram usadas para validação das configurações de *docking*, por meio do re-docking.

Os valores obtidos de RMSD foram de 0,785 Å para tubulina e 0,085 Å para a Bcl-2 (Fig. 6). Valores aceitáveis e considerados bons de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) são $\leq 2,0$ Å (Sharma et al., 2018). Desta forma, o protocolo de encaixe utilizado foi capaz de prever com precisão a pose original dos co-cristalizados, confirmando a confiança do nosso estudo *docking*.

Fig. 6. Sobreposição dos ligantes co-cristalizados.



Fonte: O autor (2022). (A): colchicina co-cristalizada na tubulina (1SA0), em verde e colchicina obtida através de docking, em cinza. (B): DRO co-cristalizada na Bcl-2 (2W3L), em azul e DRO obtida através de docking em rosa. Imagens criada a partir do software PyMOL.

Os terpenos testados apresentam maior caráter apolar, dessa forma, é esperado que as interações envolvidas fossem interações de menor energia com os resíduos do sítio ativo dos

receptores. Dentre as moléculas utilizadas apenas o nerolidol apresentou capacidade de doar e receber ligações de hidrogênio. Além disso, apresenta menor energia total, -2488,93 eV, indicativo de composto mais estável e maior polaridade (2,07 D) que os demais compostos analisados (Tabela 4).

Tabela 4

Propriedades físico-químicas dos compostos obtidos por método quântico semi-empírico PM7 a partir do pacote computacional MOPAC2016.

Ligantes	ΔH_f kcal.mo l ⁻¹	E _{total} eV	Dipolo D	E _{HOMO} eV	E _{LUMO} eV	Área Å ²	Volume Å ³
(+) - Valenceno	-21,47	-2167,04	0,96	-9,145	1,279	253,36	294,04
α - Pineno	5,84	-1443,89	0,40	-9,061	1,307	182,73	196,99
β - Cariofileno	-5,61	-2166,32	0,62	-8,973	1,257	245,28	295,58
(-) - α - Copaeno	-9,77	-2166,53	0,33	-8,970	1,358	248,48	289,94
Nerolidol	-63,34	-2488,93	2,07	-9,010	0,818	265,88	331,86

Fonte: O autor (2022).

A **Tabela 5** mostra os resultados obtidos na simulação de *docking* molecular, onde foram usadas algumas proteínas conhecidas como alvos moleculares para diversos fármacos antineoplásicos. Os valores de energia são referentes aos melhores resultados da simulação, a fim de classificar as melhores poses encontradas para as moléculas nos sítios ativos dos receptores. Além disso, cada composto foi analisado com o intuito de identificar quais interações intermoleculares existem com os alvos moleculares.

Tabela 5

Valores de energia de interação obtidos por simulação de *docking* molecular.

Ligantes	Receptores: energia de docking (kcal/mol)			
	p53 (1T4F)	Bcl2-xL (2W3L)	Tubulina (1SA0)	DNA (1BNA)
(+) -Valenceno	-4,7	-6,8	-7,1	-5,5
α - Pineno	-3,9	-5,5	-5,3	-4,3
β - Cariofileno	-4,9	-6,6	-7,1	-5,2
(-) - α -Copaeno	-4,6	-7,1	-6,9	-5,4
Nerolidol	-3,8	-5,9	-5,3	-5,1

Fonte: O autor (2022).

Assim como nos experimentos *in vitro* o composto que teve melhores resultados foi o nerolidol. Os compostos (+)-valenceno, α -pineno, β -cariofileno, α -copaeno, apresentaram apenas interações fracas do tipo *Van der Waals* com os receptores p53, Bcl2-xL, Tubulina e o fragmento de DNA usado. Neste estudo, por outro lado o nerolidol realizou ligações de hidrogênio com os receptores Bcl2-xL, Tubulina e o fragmento de DNA (**Fig. 7**). A hidroxila

presente no grupo álcool do nerolidol favoreceu a realização das ligações de hidrogênio o que pode auxiliar na estabilidade ao receptor.

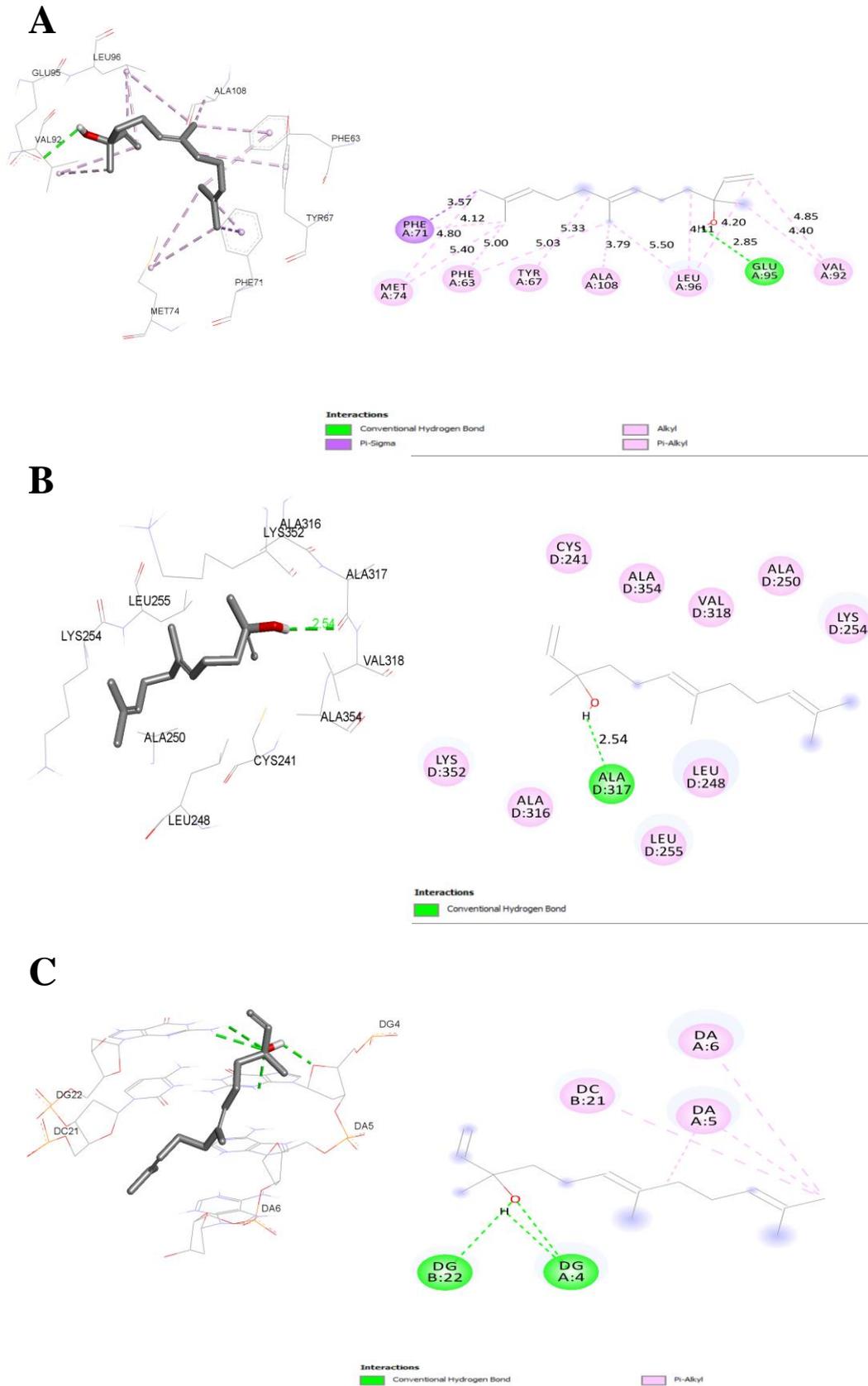
O nerolidol apresentou energia de interação com o sítio ativo da **Bcl2-xL** (PDB 2W3L) igual a -5,9 kcal/mol, e interações do tipo fracas de *Van der Waals* na porção alquílica da molécula e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Val 92 com comprimento de ligação igual a 2,85 Å. A proteína Bcl2-xL é um importante regulador negativo da apoptose, e a interação do nerolidol com a mesma, pode influenciar positivamente a apoptose celular. Esses resultados corroboram com nossos achados, na avaliação morfológica de células HeLa, onde também foi encontrado evidências de morte celular por apoptose.

Com o sítio ativo do receptor **p53** (PDB 1T4F) foi encontrado apenas interações fracas de *Van der Waals* e energia de -3,8 kcal/mol. Para o **fragmento de DNA** (PDB 1BNA) o nerolidol apresentou energia de interação de -5,1 kcal/mol e ligações de hidrogênio tanto como aceptor como doador, nos resíduos DG4 e DG22, se posicionando no sulco menor do DNA. Moléculas que interagem com o DNA, agentes antimetabólitos, são importantes no bloqueio bioquímico da síntese de DNA.

Com a **tubulina** (PDB 1SA0) a energia obtida da pose foi de -5,3 kcal/mol e houve ligação de hidrogênio entre nerolidol e o resíduo Ala 317 do sítio ativo, com comprimento de ligação 2,54 Å. As tubulinas constituem os microtúbulos responsáveis por diversas funções celulares, entre elas o transporte de organelas e divisão celular, estas proteínas são alvos de diversos ligantes que interferem na polimerização dos microtúbulos, geralmente se ligam em três locais distintos, os sítios da colchicina, vimblastina e paclitaxel (Ravelli et al., 2004). O trecho analisado (1SA0) é um domínio de ligação da **tubulina** com a colchicina, o que faz desse um alvo interessante em estudos de bloqueio do ciclo celular. A possível interação do nerolidol com tubulinas e/ou DNA sugerem que este possa ainda interferir no ciclo celular.

Em conclusão, o nerolidol demonstrou maior capacidade anticâncer *in vitro* e menor citotoxicidade para linhagem celular não tumoral, entre os terpenos testados. Os resultados *in vitro* e *in silico* apoiam que o nerolidol pode estar induzindo morte celular por apoptose, embora, outros mecanismos intermediários como autofagia e bloqueio do ciclo celular também podem estar atuando.

Fig. 7. Representação em 2D e 3D das interações entre o nerolidol e os receptores.



Fonte: O autor (2022). (A): Bcl2-xL, PDB 2W3L. (B): Tubulina, PDB 1SA0. (C): DNA, PDB 1BNA.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu nenhuma bolsa específica de agências de fomento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Referências

- Asaikumar, L., Vennila, L., Akila, P., Sivasangari, S., Kanimozhi, K., Premalatha, V., Sindhu, G., 2019. Preventive effect of nerolidol on isoproterenol induced myocardial damage in Wistar rats: Evidences from biochemical and histopathological studies. *Drug Dev. Res.* 80, 814–823. <https://doi.org/10.1002/ddr.21564>.
- Bayala, B., Bassole, I.H.N., Maqdasy, S., Baron, S., Simpore, J., Lobaccaro, J.M.A., 2018. *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils have cytotoxic effects on tumor cell cultures. Identification of citral as a new putative anti-proliferative molecule. *Biochimie* 153, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.02.013>
- Bezerra, C.F., Júnior, J.G. de A., Honorato, R. de L., Dos Santos, A.T.L., da Silva, J.C.P., da Silva, T.G., Leal, A.L.A.B., de Freitas, T.S., Vieira, T.A.T., Rocha, J.E., Sales, D.L., Filho, J.M.B., de Sousa, G.R., Pinheiro, A.P., Ribeiro-Filho, J., Coutinho, H.D.M., Morais-Braga, M.F.B., da Silva, T.G., 2020. Antifungal properties of nerolidol-containing liposomes in association with fluconazole. *Membranes (Basel)*. 10, 1–12. <https://doi.org/10.3390/membranes10090194>
- Biazi, B.I., Zanetti, T.A., Baranoski, A., Corveloni, A.C., Mantovani, M.S., 2017. Cis-Nerolidol Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells through Extensive CYP2C19 and CYP1A2 Oxidation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 121, 334–341. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12772>
- Boutanaev, A.M., Moses, T., Zi, J., Nelson, D.R., Mugford, S.T., Peters, R.J., Osbourn, A., 2015. Investigation of terpene diversification across multiple sequenced plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E81–E88. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419547112>
- Chan, W.K., Tan, L.T.H., Chan, K.G., Lee, L.H., Goh, B.H., 2016. Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities, *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules21050529>
- de Moura, D.F., Rocha, T.A., de Melo Barros, D., da Silva, M.M., dos Santos Santana, M., Neta, B.M., Cavalcanti, I.M.F., Martins, R.D., da Silva, M.V., 2021. Evaluation of the antioxidant, antibacterial, and antibiofilm activity of the sesquiterpene nerolidol. *Arch. Microbiol.* 203, 4303–4311. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02377-5>
- Dong, J., Chang, W., Chen, S., 2021. Phytochemistry Nerolidol inhibits proliferation of leiomyoma cells via reactive oxygen species-induced DNA damage and downregulation of the ATM / Akt pathway. *Phytochemistry* 191, 112901. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112901>
- Gasteiger, J., Marsili, M., 1978. A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Lett.* 19, 3181–3184. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)94977-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)94977-9)

- Girola, N., Figueiredo, C.R., Farias, C.F., Azevedo, R.A., Ferreira, A.K., Teixeira, S.F., Capello, T.M., Martins, E.G.A., Matsuo, A.L., Travassos, L.R., Lago, J.H.G., 2015. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467, 928–934. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.041>
- Gu, W., Chen, J., Patra, P., Yang, X., Gu, Q., Wei, L., Acker, J.P., Kong, B., 2017. Nanoformulated water-soluble paclitaxel to enhance drug efficacy and reduce hemolysis side effect. *J. Biomater. Appl.* 32, 66–73. <https://doi.org/10.1177/0885328217708458>
- Halgren, T.A., 1996. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* 17, 490–519.
- Lichota, A., Gwozdziński, K., 2018. Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113533>
- Liu, S., Zhao, Y., Cui, H.F., Cao, C.Y., Zhang, Y.B., 2016. 4-Terpineol exhibits potent in vitro and in vivo anticancer effects in Hep-G2 hepatocellular carcinoma cells by suppressing cell migration and inducing apoptosis and sub-G1 cell cycle arrest. *J. B.U.ON.* 21, 1195–1202.
- Ma, Z., Xu, L., Liu, D., Zhang, X., Di, S., Li, W., Zhang, J., Reiter, R.J., Han, J., Li, X., Yan, X., 2020. Utilizing Melatonin to Alleviate Side Effects of Chemotherapy: A Potentially Good Partner for Treating Cancer with Ageing. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6841581>
- Mahmoud, T.S., Marques, M.R., do Ó Pessoa, C., Lotufo, L.V.C., Magalhães, H.I.F., de Moraes, M.O., de Lima, D.P., Tininis, A.G., de Oliveira, J.E., 2011. In vitro cytotoxic activity of brazilian middle west plant extracts. *Brazilian J. Pharmacogn.* 21, 456–464. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000061>
- Martins, B.X., Arruda, R.F., Costa, G.A., Jerdy, H., de Souza, S.B., Santos, J.M., de Freitas, W.R., Kanashiro, M.M., de Carvalho, E.C.Q., Sant’Anna, N.F., Antunes, F., Martinez-Zaguilan, R., Souad, S., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R., 2019. Myrtenal-induced V-ATPase inhibition - A toxicity mechanism behind tumor cell death and suppressed migration and invasion in melanoma. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1863, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.006>
- Mendanha, S.A., Moura, S.S., Anjos, J.L.V., Valadares, M.C., Alonso, A., 2013. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicol. In Vitro* 27, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.022>
- MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 16, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Pagadala, N.S., Syed, K., Tuszynski, J., 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophys. Rev.* 9, 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>

- Popiołkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J.S., Mazurek, A.P., 2005. In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs - Genistein glycosides. *Cancer Lett.* 229, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.014>
- Priyadarshini, K., Keerthi, A.U., 2012. Paclitaxel Against Cancer: A Short Review. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. 2, 139–141. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000130>
- Pudełek, M., Catapano, J., Kochanowski, P., Mrowiec, K., Janik-Olchawa, N., Czyż, J., Ryszawy, D., 2019. Therapeutic potential of monoterpene α -thujone, the main compound of *Thuja occidentalis* L. essential oil, against malignant glioblastoma multiforme cells in vitro. *Fitoterapia* 134, 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.02.020>
- Raj, V., Venkataraman, B., Almarzooqi, S., Chandran, S., Ojha, S.K., Attoub, S., Adrian, T.E., Subramanya, S.B., 2020. Nerolidol mitigates colonic inflammation: An experimental study using both in vivo and in vitro models. *Nutrients* 12, 1–28. <https://doi.org/10.3390/nu12072032>
- Ravelli, R.B.G., Gigant, B., Curmi, P.A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., Knossow, M., 2004. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 428, 198–202. <https://doi.org/10.1038/nature02393>
- Saito, A.Y., Sussmann, R.A.C., Kimura, E.A., Cassera, M.B., Katzin, A.M., 2015. Quantification of nerolidol in mouse plasma using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 111, 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.030>
- Sharma, V., Amarnath, N., Shukla, S., Ayana, R., Kumar, N., Yadav, N., Kannan, D., Sehrawat, S., Pati, S., Lochab, B., Singh, S., 2018. Benzoxazine derivatives of phytophenols show anti-plasmodial activity via sodium homeostasis disruption. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 28, 1629–1637. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.047>
- Shrestha, S., Song, Y.W., Kim, H., Lee, D.S., Cho, S.K., 2016. Sageone, a diterpene from *Rosmarinus officinalis*, synergizes with cisplatin cytotoxicity in SNU-1 human gastric cancer cells. *Phytomedicine* 23, 1671–1679. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.09.008>
- Silva, B.I.M., Nascimento, E.A., Silva, C.J., Silva, T.G., Aguiar, J.S., 2021. Anticancer activity of monoterpenes: a systematic review. *Mol. Biol. Rep.* 48, 5775–5785. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06578-5>
- Silva, M.P., de Oliveira, R.N., Mengarda, A.C., Roquini, D.B., Allegretti, S.M., Salvadori, M.C., Teixeira, F.S., de Sousa, D.P., Pinto, P.L.S., da Silva Filho, A.A., de Moraes, J., 2017. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.06.005>
- Singh, U.C., Kollman, P.A., 1984. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* 5, 129–145. <https://doi.org/10.1002/jcc.540050204>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Wei, K.C., Chen, R.F., Chen, Y.F., Lin, C.H., 2019. Hinokitiol suppresses growth of B16 melanoma by activating ERK/MKP3/proteasome pathway to downregulate survivin expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 366, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.015>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nerolidol apresentou maior capacidade antitumoral e menor citotoxicidade para células saudáveis, entre os terpenos testados. Os resultados dos ensaios *in vitro* e *in silico* apontam que, o nerolidol pode induzir morte por apoptose nas células HeLa e que, outros mecanismos como autofagia e bloqueio do ciclo celular podem influenciar neste processo.

É pertinente a progressão dos estudos antitumorais com o nerolidol, haja vista, a capacidade antitumoral expressada e as vantagens que este composto oferece, como o custo e toxicidade significativamente inferiores aos quimioterápicos padrões.

Embora os monoterpenos utilizados neste trabalho não tenham apresentado resultados expressivos, nas condições aplicadas, esta classe de composto merece destaque diante da versatilidade de mecanismos envolvidos na morte de células tumorais.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, H. M. I. et al. Protective effect of some natural products against chemotherapy-induced toxicity in rats. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01590, 2019.
- ABDALLAH, I. I.; QUAX, W. J. A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids. **KnE Life Sciences**, v. 3, n. 5, p. 81, 2017.
- AMBROŽ, M. et al. The influence of sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 15343–15358, 2015.
- AMBROŽ, M. et al. Sesquiterpenes α -humulene and β -caryophyllene oxide enhance the efficacy of 5-fluorouracil and oxaliplatin in colon cancer cells. **Acta Pharmaceutica**, v. 69, n. 1, p. 121–128, 2019.
- ANDRADE-OCHOA, S. et al. In vitro and in silico studies of terpenes, terpenoids and related compounds with larvicidal and pupaecidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Chemistry Central Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2018.
- ARUNACHALAM, S. et al. Nerolidol attenuates oxidative stress, inflammation, and apoptosis by modulating nrf2/mapk signaling pathways in doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, 2021.
- AYDIN, E.; TÜRKEZ, H.; KELEŞ, M. S. Potential anticancer activity of carvone in N2a neuroblastoma cell line. **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 8, p. 764–772, 2015.
- BADAWY, M. E. I. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of hydrocarbon and oxygenated monoterpenes against some foodborne pathogens through in vitro and in silico studies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 158, n. February, p. 185–200, 2019.
- BEZERRA, C. F. et al. Antifungal properties of nerolidol-containing liposomes in association with fluconazole. **Membranes**, v. 10, n. 9, p. 1–12, 2020.
- BIAZI, B. I. et al. Cis-Nerolidol Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells through Extensive CYP2C19 and CYP1A2 Oxidation. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 121, n. 4, p. 334–341, 2017.
- BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 85–100, 2020.
- BORIS, R. et al. Cytotoxic properties of selected sesquiterpene alcohols on human cervix carcinoma cell lines. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 14, n. 3, p. 316–319, 2011.
- BOUTANAIEV, A. M. et al. Investigation of terpene diversification across multiple sequenced plant genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 1, p. E81–E88, 2015.

BRAHMKSHATRIYA, P. P.; BRAHMKSHATRIYA, P. S. Terpenes: Chemistry, biological role, and therapeutic applications. **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**, p. 2665–2691, 2013.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRAY, F. et al. **Section of Cancer Surveillance (CSU)**. [s.l.: s.n.].

CHAN, W. K. et al. **Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities**. [s.l.: s.n.]. v. 21

COSTA, E. V. et al. Antitumor properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 81, n. 7, p. 563–567, 2015.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.

DE MOURA, D. F. et al. Evaluation of the antioxidant, antibacterial, and antibiofilm activity of the sesquiterpene nerolidol. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 4303–4311, 2021.

DING, X.; CHEN, H. Anticancer effects of Carvone in myeloma cells is mediated through the inhibition of p38 MAPK signalling pathway, apoptosis induction and inhibition of cell invasion. **Journal of B.U.ON.**, v. 23, n. 3, p. 747–751, 2018.

DONG, J.; CHANG, W.; CHEN, S. Nerolidol inhibits proliferation of leiomyoma cells via reactive oxygen species-induced DNA damage and downregulation of the ATM / Akt pathway. **Phytochemistry**, v. 191, n. August, p. 112901, 2021.

FRAISER, L. H.; KANEKAL, S.; KEHRER, J. P. Cyclophosphamide Toxicity. **Drugs**, v. 42, n. 5, p. 781–795, 1991.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.

GOUDA, M. et al. Effects of four natural antioxidant phenyl terpenes on emulsifying and rheological properties of egg yolk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 83, p. 59–67, 2017.

GUEDES, I. A.; PEREIRA, F. S. S.; DARDENNE, L. E. Empirical scoring functions for structure-based virtual screening: Applications, critical aspects, and challenges. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. SEP, p. 1–18, 2018.

GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: A patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 3, p. 243–265, 2014.

GUPTA, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? **Computational Biology and Chemistry**, v. 76, p. 210–217, 2018.

HANUŠOVÁ, V. et al. The effects of β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, n. September, p. 828–836, 2017.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: 2019, 2019.

INJAC, R.; STRUKELJ, B. **Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity** *Technology in Cancer Research and Treatment*, 2008.

IQUBAL, A. et al. Nerolidol attenuates cyclophosphamide-induced cardiac inflammation, apoptosis and fibrosis in Swiss Albino mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 863, n. May, 2019a.

IQUBAL, A. et al. Nerolidol ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, neuroinflammation and cognitive dysfunction: Plausible role of Nrf2 and NF- κ B. **Life Sciences**, v. 236, n. August, p. 116867, 2019b.

IQUBAL, A. et al. Effect of nerolidol on cyclophosphamide-induced bone marrow and hematologic toxicity in Swiss albino mice. **Experimental Hematology**, v. 82, p. 24–32, 2020.

JANSEN, C. et al. Myrcene and terpene regulation of TRPV1. **Channels**, v. 13, n. 1, p. 344–366, 2019.

JARDIM, D. L. et al. Efficacy and safety of anticancer drug combinations: a meta-analysis of randomized trials with a focus on immunotherapeutics and gene-targeted compounds. **OncoImmunology**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2020.

JAYAKUMAR, T. et al. Hinokitiol inhibits migration of A549 lung cancer cells via suppression of MMPs and induction of antioxidant enzymes and apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–13, 2018.

JENKINS, V. et al. A 3-year prospective study of the effects of adjuvant treatments on cognition in women with early stage breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 6, p. 828–834, 2006.

JIAO, X. et al. A comprehensive application: Molecular docking and network pharmacology for the prediction of bioactive constituents and elucidation of mechanisms of action in component-based Chinese medicine. **Computational Biology and Chemistry**, v. 90, n. December 2020, p. 107402, 2021.

JOHN, M. Natural Products In Drug Discovery : The Past , Present And Future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. February, p. 3–8, 2002.

JULES-ELYSEE, K.; WHITE, D. A. Bleomycin-Induced Pulmonary Toxicity. **Clinics in Chest Medicine**, v. II, n. March, p. 5231, 1990.

KENNEDY, B. J. 5-Fluorouracil toxicity: Old or new? **Cancer**, v. 86, n. 7, p. 1099–1100,

1999.

KIRBY, J. et al. Engineering a functional 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 38, n. September, p. 494–503, 2016.

KLAUNIG, J. E.; WANG, Z. Oxidative stress in carcinogenesis. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 116–121, 2018.

LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11 SUPPL., p. S247–S250, 2008.

LEE, J. C. et al. Oxidative stress and metal carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 4, p. 742–757, 2012.

LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 11, n. 2, p. 320–328, 2019.

LICHOTA, A.; GWOZDZINSKI, K. Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018.

LIN, S. Y. et al. Necroptosis promotes autophagy-dependent upregulation of DAMP and results in immunosurveillance. **Autophagy**, v. 14, n. 5, p. 778–795, 2018.

LIU, Y. et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 5, n. 5, p. 708–729, 2015.

MA, Z. et al. Utilizing Melatonin to Alleviate Side Effects of Chemotherapy: A Potentially Good Partner for Treating Cancer with Ageing. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

MAASE, H. et al. Metastatic Bladder Cancer : Results of a Large ., **Society**, v. 17, n. 17, p. 3068–3077, 2000.

MARQUES, F. M. et al. In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 281–289, 2019.

MEERAN, M. F. N. et al. Nerolidol, a Sesquiterpene from the Essential Oils of Aromatic Plants, Attenuates Doxorubicin-Induced Chronic Cardiotoxicity in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 26, p. 7334–7343, 2021.

MENDANHA, S. A. et al. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 27, n. 1, p. 323–329, 2013.

MERCK. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt>. Acessado em 20 de dezembro de 2021.

MOHAJERI, M.; SAHEBKAR, A. Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 122, n. August 2017, p. 30–51, 2018.

MOHAMMADINEJAD, R. et al. Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. **Autophagy**, v. 15, n. 1, p. 4–33, 2019.

MOOLGAVKAR, S.; LUEBECK, G. Multistage Carcinogenesis: A Unified Framework for Cancer Data Analysis. In: ALMUDEVAR, A.; OAKES, D.; HALL, J. (Eds.). . **Statistical Modeling for Biological Systems: In Memory of Andrei Yakovlev**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 117–136.

NURGALI, K.; JAGOE, R. T.; ABALO, R. Editorial: Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. MAR, p. 1–3, 2018.

PEARCE, A. et al. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–12, 2017.

PERILLO, B. et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 192–203, 2020.

RAJ, V. et al. Nerolidol mitigates colonic inflammation: An experimental study using both in vivo and in vitro models. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 1–28, 2020.

REILING, K. K. et al. Mono and diterpene production in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 200–212, 2004.

ROSENTHAL, S.; KAUFMAN, S. Vincristine Neurotoxicity. **Annals of Internal Medicine**, v. 80, n. 6, p. 733–737, 1 jun. 1974.

ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R. C. Paclitaxel (Taxol) _ Enhanced Reader.pdf. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 1004–1014, 1995.

SAITO, A. Y. et al. Quantification of nerolidol in mouse plasma using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 100–103, 2015.

SANDARGO, B. et al. Antiviral Meroterpenoid Rhodatin and Sesquiterpenoids Rhodocoranes A-E from the Wrinkled Peach Mushroom, *Rhodotus palmatus*. **Organic Letters**, v. 21, n. 9, p. 3286–3289, 2019.

SHARIFI-RAD, M. et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675–1687, 2018.

SHEN, C. et al. From machine learning to deep learning: Advances in scoring functions for protein–ligand docking. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2020.

SHERR, C. J.; BARTEK, J. Cell cycle-Targeted cancer therapies. **Annual Review of Cancer**

Biology, v. 1, p. 41–57, 2017.

SHIH, Y.-H. et al. In vitro antimicrobial and anticancer potential of hinokitiol against oral pathogens and oral cancer cell lines. **Microbiological Research**, v. 168, n. 5, p. 254–262, 2013.

SHRESTHA, S. et al. Sageone, a diterpene from *Rosmarinus officinalis*, synergizes with cisplatin cytotoxicity in SNU-1 human gastric cancer cells. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1671–1679, 2016.

SIEDLECKA-KROPLEWSKA, K.; WOZNIAK, M.; KMIEC, Z. The wine polyphenol resveratrol modulates autophagy and induces apoptosis in MOLT-4 and HL-60 human leukemia cells. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 70, n. 6, 2019.

SILVA, B. I. M. et al. Anticancer activity of monoterpenes: a systematic review. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 7, p. 5775–5785, 2021.

SILVA, M. P. et al. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. 467–472, 2017.

SINGH, K. et al. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 2, p. 177–190, 2018.

SOERJOMATARAM, I. et al. Cancers related to lifestyle and environmental factors in France in 2015. **European Journal of Cancer**, v. 105, p. 103–113, 2018.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SYLVESTRE, M. et al. Composition and Cytotoxic Activity of the Leaf Essential Oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter Muriel. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 536–540, 2007.

TEMML, V.; KUTIL, Z. Structure-based molecular modeling in SAR analysis and lead optimization. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 1431–1444, 2021.

TOMKO, A. M. et al. Anti-cancer potential of cannabis terpenes in a taxol-resistant model of breast cancer. 2021.

WHITE, E.; LATTIME, E. C.; GUO, J. Y. Autophagy Regulates Stress Responses, Metabolism, and Anticancer Immunity. **Trends in Cancer**, v. 7, n. 8, p. 778–789, 2021.

YAMASHITA, A. et al. Inhibitory effects of metachromin A on hepatitis B virus production via impairment of the viral promoter activity. **Antiviral Research**, v. 145, p. 136–145, 2017.

YUAN, R. et al. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1401, n. 1, p. 19–27, 2017.

ZEBEC, Z. et al. Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 34, p. 37–43, 2016.

ZER, A. et al. Multi-agent chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma (STS) – A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 63, p. 71–78, 2018.

ZHANG, Y. et al. The combinatory effects of natural products and chemotherapy drugs and their mechanisms in breast cancer treatment. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 5, p. 1179–1197, 2020.

APÊNDICE A – ANTICANCER ACTIVITY OF MONOTERPENES: A SYSTEMATIC REVIEW

O artigo “Anticancer activity of monoterpenes: a systematic review” foi publicado no periódico *Molecular Biology Reports*, volume 48, p. 5775-5785, 2021, link para acesso: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06578-5>.

Molecular Biology Reports (2021) 48:5775–5785
<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06578-5>

REVIEW



Anticancer activity of monoterpenes: a systematic review

Bruno I. M. Silva¹ · Erika A. Nascimento¹ · Cleber J. Silva¹ · Teresinha G. Silva¹ · Jaciana S. Aguiar¹

Received: 24 May 2021 / Accepted: 15 July 2021 / Published online: 24 July 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

Secondary metabolites have been recognized for centuries as medicinal agents, in particular monoterpenes which have been the target of research in the discovery of antineoplastic drugs, as they have potential antitumor effect and low toxicity and are used as additives in foods and cosmetics. Another advantage of monoterpenes is structural diversity, which gives greater plasticity when interacting with cells. The purpose of this review was to summarize and critically discuss the anticancer potential of monoterpenes and their respective mechanisms of action. A systematic review of articles in the MEDLINE/ PubMed, Web of Science, Scopus and Science Direct electronic databases was independently conducted by three reviewers using the combination of the following keywords: monoterpenes AND anticancer AND in vitro. Restriction in selecting articles followed pre-established inclusion and exclusion criteria by the reviewers, and also a time limitation with works published between 2015 and 2019 being selected. In total, 39 works were deemed eligible for inclusion in the final review. Monoterpenes have cytotoxic activity in a wide variety of tumor cell lines, and mainly appear to exert this effect by inducing apoptosis caused by oxidative stress. In addition, improved use of monoterpenes when used in drug delivery systems and the synergistic effect with conventional chemotherapeutic drugs are reported. These findings validate this class of compounds as a promising source of chemotherapeutic drugs yet to be explored.

Keywords Iridoids · Antineoplastic · Oxidative stress · Apoptosis · Cytotoxicity

Introduction

Cancer is a disease which can affect any part of the body, presenting typical characteristics such as abnormal cell growth and the potential to invade or spread to different parts of the body. Cancer is currently one of the main causes of morbidity and mortality in the contemporary world, second only to cardiovascular diseases [1].

There are several methods for treating cancer such as surgery, radiotherapy, immunotherapy and chemotherapy; however, chemotherapy is still the most practiced method due to limitations inherent to each method and also access to the affected area. There are several chemotherapy drugs which have been used for years, but they have serious side effects such as myelosuppression, inflammation, hair loss, among others which impose limitation on use [2]. In addition, the development of cancer cell resistance to multiple drugs is the main cause of ineffectiveness in chemotherapy [3]. That said, it is still necessary to search for new chemopreventive and anti-tumor agents which have specificity in relation to tumor cells with minimal effect on healthy cells. Thus, phytochemicals have aroused interest because they have an anti-tumor effect to various types of cancer and minimal cytotoxicity to normal cells [4].

Terpenes are generally formed by basic hydrocarbon units with 5 carbons (isoprenes) and can be classified based on the number of carbons present in their structure: hemiterpene (5C); monoterpene (10C); sesquiterpene (15C); diterpene (20C); sesterpene (25C); triterpene (30C); and polyterpene (> 30C). However, some terpenes have a carbon content

✉ Jaciana S. Aguiar
 jaciana.a.aguiar@ufpe.br
 Bruno I. M. Silva
 bruno.iraquitam@ufpe.br
 Erika A. Nascimento
 erika.arruda@ufpe.br
 Cleber J. Silva
 cleberjosesilva@ufpe.br
 Teresinha G. Silva
 teresinha.goncalves@ufpe.br

¹ Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Gluska, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fone: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 11 de maio de 2021

Ofício nº 23/21

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. Jaciana dos Santos Aguiar

Departamento de Antibióticos

processo nº002/2021

Certificamos que a proposta intitulada “Atividade Antitumoral de Mono e Sesquiterpenos”, registrado com o nº002/2021 sob a responsabilidade da Prof. Jaciana dos Santos Aguiar Que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/04/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	abril/2021 e junho/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico/albinos Swiss (<i>Mus musculus</i>)
Nº de animais	58
Peso/Idade	20 - 25 g / 45 dias
Sexo	(56 Femea)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Atenciosamente


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691