



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**THIAGO SARDOU CHARRET**

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO  
DE *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon winterianus*  
E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS FRENTE A  
LINHAGEM DE CÂNCER CERVICAL (HeLa)

Tese de Doutorado submetida a  
Universidade Federal Fluminense visando à obtenção do grau de  
Doutor em Ciências e Biotecnologia

**Orientador: Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado**  
**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius D'Avila Bitencourt Pascoal**



Niterói, 2024

**THIAGO SARDOU CHARRET**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon winterianus* E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS FRENTE A LINHAGEM DE CÂNCER CERVICAL (HeLa)**

Trabalho desenvolvido no Laboratório Multiusuário de Cultura de Células e Tecidos animais do Departamento de Ciências Básicas do Instituto de Saúde de Nova Friburgo, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense. Apoio Financeiro: CAPES.

Tese de Doutorado submetida a Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia

**Orientador: Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado**  
**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius D'Avila Bitencourt Pascoal**

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

C485a Charret, Thiago Sardou  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon winterianus* E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS FRENTE A LINHAGEM DE CÂNCER CERVICAL (HeLa) / Thiago Sardou Charret. - 2024.  
74 f.: il.

Orientador: Ricardo Luiz Dantas Machado.  
Coorientador: Aislán Cristina Rheder Fagundes Pascoal.  
Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, 2024.

1. Câncer Cervical. 2. Produtos Naturais. 3. Gênero *Cymbopogon*. 4. HeLa. 5. Produção intelectual. I. Machado, Ricardo Luiz Dantas, orientador. II. Pascoal, Aislán Cristina Rheder Fagundes, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

# THIAGO SARDOU CHARRET

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE *Cymbopogon flexuosus*, *Cymbopogon winterianus* E SEUS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS FRENTE A LINHAGEM DE CÂNCER CERVICAL (HeLa)

Tese de Doutorado submetida a Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia

### Banca Examinadora:

Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal – Departamento de Ciências Básicas - Universidade Federal Fluminense

---

Nome Completo – Departamento – Instituição (Orientador/Presidente)

Caroline de Souza Barros - Departamento de Imunobiologia- Universidade Federal Fluminense

---

Nome Completo – Departamento – Instituição

Marcio Adriano Andréo – Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de São Paulo

---

Nome Completo – Departamento - Instituição

Paula Araújo de Monteiro Mafra - Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual - Universidade Estadual de Campinas

---

Nome Completo – Departamento - Instituição

Daniela Gonçalves Galasse Rando – Departamento de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas - Universidade Federal de São Paulo

---

Nome Completo – Departamento – Instituição

Giovani Carlo Veríssimo da Costa – Departamento de Ciências Básicas – Universidade Federal Fluminense

---

Nome Completo – Departamento – Instituição

Andréa Regina Baptista – Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Universidade Federal Fluminense

---

Nome Completo – Departamento – Instituição (Suplente)

Caroline Caramano de Loureço – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas

---

Nome Completo – Departamento – Instituição (Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus orientadores, Aislan e Vinicius, por confiarem na minha capacidade. Obrigado por acreditarem em mim e por contribuírem significativamente para o meu desenvolvimento profissional. Aprendi muito com vocês desde a iniciação científica na graduação. Agradeço também ao Professor Ricardo por aceitar me orientar e permitir que esse trabalho fosse realizado.

Agradeço à minha mãe Angela por tudo, sem seu apoio e dedicação eu não conseguiria ter chegado tão longe. Agradeço ao meu Pai Sérgio, por ter me educado para ser o homem que sou hoje, sei está olhando por mim. A minha sogra Jane, por todo o carinho que tem por mim. Agradeço à minha namorada Mariana por toda a ajuda, amor e dedicação, juntos somos muito melhores.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, a presença de vocês torna o trabalho mais leve. Agradeço em especial ao Júlio por todas as conversas e ideias trocadas e por toda a ajuda no dia a dia do laboratório.

Agradeço aos colaboradores desse trabalho em especial à Professora Dr. Raquel Castiglione, à Professora Patrícia Severino e ao Professor Alberto Wisniewski Jr. A colaboração de vocês foi fundamental para o enriquecimento desse trabalho.

Por fim, agradeço Programa de Pós Graduação em Ciências e Biotecnologia da Universidade Federal Fluminense (PPBI-UFF) e a CAPES pela oportunidade em estar desenvolvendo o presente trabalho.

# Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS .....	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	IX
RESUMO .....	XI
ABSTRACT .....	XII
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 OS PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS MEDICAMENTOS .....	15
1.2 O GÊNERO <i>Cymbopogon</i> .....	16
1.3 <i>Cymbopogon flexuosus</i> e <i>Cymbopogon winterianus</i> .....	17
1.4 COMPLEXAÇÃO COM CICLODEXTRINAS.....	19
1.5 O CÂNCER E O FENÔMENO DA RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS .....	19
1.6 O CÂNCER CERVICAL.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1 MATERIAIS E REAGENTES .....	25
3.2 CULTURA CELULAR.....	25
3.3 ANÁLISE DE AMOSTRA POR CROMATOGRAFIA A GÁS / ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC/MS).....	26
3.4 COMPLEXAÇÃO DAS AMOSTRAS COM $\beta$ -CICLODEXTRINA .....	27
3.4.1 OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM $\beta$ -CICLODEXTRINA..	27
3.4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO - ANÁLISE TÉRMICA .....	27
3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO.....	28
3.5.1 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT .....	28
3.4.2 ÍNDICE DE SELETIVIDADE .....	29
3.4.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – <i>WOUND HEALING ASSAY</i> .....	30
3.4.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO - CÉLULAS HeLa .....	31
4. RESULTADOS .....	33
4.1. ANÁLISE DE AMOSTRA POR CROMATOGRAFIA A GÁS / ESPECTROMETRIA DE MASSAS MODO SCAN (GC/MS) .....	33
4.2 ANÁLISE TÉRMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO $\beta$ -CICLODEXTRINA - CITRONELAL.....	39
4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT.....	42
4.4 AVALIAÇÃO DO ÍNCICE DE SELETIVIDADE .....	48

4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – <i>WOUND HEALING</i> .....	49
4.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	53
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO .....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
8. ANEXOS.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Ciclodextrina
MDR	Resistencia a múltiplas drogas
HPV	Papiloma vírus humano
SFB	Soro Fetal Bovino
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
MTT	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
GC/MS	Cromatografia a gás / espectrometria de massas
MF	Mistura física
CoE	Co-evaporado
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
TG/DTG	Termogravimetria
CF	Óleo essencial de <i>C. flexuosus</i>
CW	Óleo essencial de <i>C. winterianus</i>
CI	Citral
CO	Citronelal
$\beta$ -CI	Citral complexado com $\beta$ -ciclodextrina
$\beta$ -CO	Citronelal complexado com $\beta$ -ciclodextrina
DOX	Doxorrubicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%
IS	Índice de seletividade
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PI	Iodeto de propídio

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Distribuição geográfica de <i>C. flexuosus</i> e <i>C. winterianus</i> , no Brasil	18
Figura 2:	Cromatograma do óleo essencial de <i>C. flexuosus</i>	33
Figura 3:	Estruturas químicas de substâncias identificadas no óleo essencial de <i>C. flexuosus</i> .	34
Figura 4:	Cromatograma do Óleo essencial de <i>C. winterianus</i>	34
Figura 5:	Estruturas químicas de substâncias identificadas no óleo essencial de <i>C. winterianus</i> .	37
Figura 6:	Perfis DSC de $\beta$ -ciclodextrina, Citronelal e complexo de inclusão citronelal: $\beta$ -ciclodextrina, CoE e MF.	40
Figura 7:	Curvas TG-DTG de $\beta$ -ciclodextrina, Citronelal e complexo de inclusão preparado por CoE e MF.	41
Figura 8:	Ensaio de viabilidade celular de MTT, em células HeLa ( <i>C. flexuosus</i> , Citral e Citral complexado).	43
Figura 9:	Ensaio de viabilidade celular de MTT em células HeLa ( <i>C. winterianus</i> , Citronelal e Citronelal complexado).	44
Figura 10:	Ensaio de viabilidade celular de MTT em células HeLa (Doxorrubicina).	45
Figura 11:	Ensaio de viabilidade celular de MTT em células NIH-3t3 ( <i>C. flexuosus</i> , Citral e Citral complexado).	46
Figura 12:	Ensaio de viabilidade celular de MTT em células NIH-3t3 ( <i>C. winterianus</i> , Citronelal e Citronelal complexado).	47
Figura 13:	Ensaio de viabilidade celular de MTT em células NIH-3t3 (Doxorrubicina).	48
Figura 14:	Migração celular em células HeLa	50
Figura 15:	Fotomicrografias representativas do ensaio wound healing de células HeLa, série CF.	51
Figura 16:	Fotomicrografias representativas do ensaio wound healing de células HeLa, série CW.	52
Figura 17:	Histogramas representativos da análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células HeLa, série CF.	54
Figura 18:	Histogramas representativos da análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células HeLa série CW.	54
Figura 19:	Avaliação do ciclo celular	55

Tabela 1:	Incidência e Mortalidade do câncer no mundo	21
Tabela 2:	Compostos identificados na amostra de <i>C. flexuosus</i> por GC/MS	35
Tabela 3:	Compostos identificados na amostra de <i>C. winterianus</i> por GC/MS	38
Tabela 4:	Índice de Seletividade – Células HeLa e NIH-3t3	50
Tabela 5:	Média % de eventos por fase do ciclo celular em células HeLa	54

## RESUMO

O gênero *Cymbopogon*, é composto por 144 espécies, das quais, muitas possuem atividades biológicas já descritas como anticonvulsivante, anti-inflamatório e antimicrobiano. O *C. flexuosus* e *C. winterianus*, são espécies deste gênero, adaptadas e cultivadas no Brasil, onde são conhecidas popularmente como Capim Limão e Citronela, respectivamente. O câncer cervical é um tipo de câncer que afeta a extremidade inferior do útero, tendo como a principal causa a infecção pelo HPV de alto risco. Mundialmente, este tipo de câncer acomete cerca de 662 mil mulheres por ano, sendo responsável por aproximadamente 348 mil mortes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antiproliferativo dos óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C. winterianus* e seus compostos majoritários frente a linhagem de câncer cervical HeLa. Através das técnicas de CG-MS foi possível identificar os compostos  $\alpha$ -Citral (43,67%) e  $\beta$ -Citral (26,52%) como majoritários do óleo de *C. flexuosus* e Citronelal (38,89%), como composto majoritário das amostras de *C. winterianus*. Através do ensaio de viabilidade celular de MTT utilizando células HeLa, foi possível observar potencial atividade antiproliferativa, dos óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C. winterianus*, dos compostos Citral e Citronelal puros e complexados com  $\beta$ -ciclodextrina. O ensaio de MTT também foi realizado utilizando as células não tumorais NIH-3T3, tornando possível, através dos valores de IC<sub>50</sub> obtidos, calcular o índice de seletividade das amostras, que demonstraram boa seletividade, a exceção da amostra de Citral complexado. Os resultados de ensaio de migração celular *in vitro*, sugerem que as amostras testadas atuam inibindo a migração celular. Um mecanismo proposto para tais resultados está relacionado a capacidade destes compostos aumentarem a população de células na fase G2/M, com concomitante diminuição da população de células na fase G0/G1. Tomados em conjunto os resultados observados sugerem um potencial anticâncer dos óleos essenciais e seus compostos majoritários.

**Palavras-chave:** *Cymbopogon*, Citral, Citronelal, Câncer Cervical

## ABSTRACT

The genus *Cymbopogon* is made up of 144 species, many of which have already described biological activities such as anticonvulsant, anti-inflammatory and antimicrobial. *C. flexuosus* and *C. winterianus* are species of this genus, adapted and cultivated in Brazil, where they are popularly known as Capim Limão and Citronella, respectively. Cervical cancer is a type of cancer that affects the lower end of the uterus, the main cause of which is high-risk HPV infection. Worldwide, this type of cancer affects around 662 thousand women per year, being responsible for approximately 348 thousand deaths. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antiproliferative potential of the essential oils of *C. flexuosus* and *C. winterianus* and their main compounds against the HeLa cervical cancer line. Using GC-MS techniques, it was possible to identify the compounds  $\alpha$ -Citral (43.67%) and  $\beta$ -Citral (26.52%) as the majority of *C. flexuosus* oil and Citronellal (38.89%), as a compound majority of *C. winterianus* samples. Through the MTT cell viability assay using HeLa cells, it was possible to observe potential antiproliferative activity of the essential oils of *C. flexuosus* and *C. winterianus*, of the pure Citral and Citronellal compounds and those complexed with  $\beta$ -cyclodextrin. The MTT assay was also carried out using NIH-3T3 non-tumor cells, making it possible, through the IC50 values obtained, to calculate the selectivity index of the samples, which demonstrated good selectivity, with the exception of the complexed Citral sample. The results of the in vitro cell migration assay suggest that the tested samples act by inhibiting cell migration. A proposed mechanism for such results is related to the ability of these compounds to increase the cell population in the G2/M phase, with a concomitant decrease in the cell population in the G0/G1 phase. Taken together, the observed results suggest an anticancer potential of essential oils and their major compounds.

**Keywords:** *Cymbopogon*, Citral, Citronellal, Cervical Cancer

# 1. INTRODUÇÃO

Globalmente o câncer é uma das maiores complicações de saúde que acometem a humanidade, em 2022 cerca de 19 milhões de pessoas desenvolveram algum tipo de câncer. O câncer é a segunda principal causa de mortes no mundo, sendo responsável por aproximadamente 9,7 milhões de mortes em 2022. No Brasil foram estimados 627 mil novos casos de câncer em 2022 com aproximadamente 278 mil mortes (WHO, 2024).

Segundo dados do Global Cancer Observatory, o câncer cervical é um dos principais tipos de câncer entre as mulheres, com uma estimativa de incidência de 662 mil novos casos e mortalidade anual de 348 mil mulheres em 2022, em todo o mundo (WHO, 2024). A mortalidade devido ao câncer cervical em estágio avançado continua sendo um dos principais desafios clínicos em todo o mundo. Atualmente, diversas abordagens, como quimioterapia, cirurgia e/ou radioterapia ou suas combinações, são praticadas rotineiramente nas clínicas para o melhor manejo do câncer cervical. A doxorrubicina (DOX) é um dos medicamentos quimioterápicos mais eficazes e potentes usados para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer cervical nas clínicas, semelhante a qualquer outro medicamento quimioterápico convencional. A DOX também não possui especificidade/seletividade para atingir as células de câncer e, portanto, mata as células em divisão normal no corpo (PUGAZHENDHI et al., 2018). Além da resistência aos medicamentos, a toxicidade tecidual normal continua sendo um grande desafio clínico que limita o sucesso da quimioterapia.

Os produtos naturais emergem como uma excelente alternativa no desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer. Uma análise da origem

dos medicamentos desenvolvidos entre 1981 e 2019 revelou que mais de 49% dos medicamentos lançados no mercado eram derivados de produtos naturais, enquanto apenas 24% dos medicamentos desenvolvidos eram de origem sintética (NEWMAN e CRAGG, 2020). Exemplos da importância dos compostos advindos do metabolismo das plantas para o desenvolvimento de novos fármacos são os agentes quimioterápicos hoje presentes no tratamento do câncer que são provenientes de plantas como Vincristina, Vinblastina e Taxol (KINGHORN et al., 2011; NEWMAN e CRAGG, 2020) Os fitoquímicos e seus derivados têm a capacidade de aumentar a eficácia do tratamento em pacientes com câncer, além de minimizar os efeitos colaterais. Muitos desses fitoconstituintes são compostos naturais com propriedades biológicas ativas e efeitos antitumorais relevantes. Os compostos fitoquímicos geralmente atuam ao regular as vias de sinalização molecular envolvidas no desenvolvimento do câncer. Entre os mecanismos específicos, destacam-se o aumento do status antioxidante, a inativação de carcinógenos, a inibição da proliferação celular, a indução da parada do ciclo celular e apoptose, além da regulação do sistema imunológico (CHOUDHARI et al., 2020).

Espécies do gênero *Cymbopogon* emergem como boas alternativas de estudo para o desenvolvimento de novos medicamentos, na literatura científica diversas atividades biológicas já foram descritas para essa espécie como hepatoprotetora (MALIK et al., 2024), antifúngica (CUENCA-LEÓN et al., 2024), antioxidante e antimicrobiana (TAZI et al., 2024), bem como possui potencial anticâncer (KIEŁTYKA-DADASIEWICZ et al., 2024; BAYALA et al., 2023; MUKHTAR et al., 2023). Dessa forma o desenvolvimento de estudos de espécies do gênero *Cymbopogon* no câncer cervical pode auxiliar no

desenvolvimento de novos conhecimentos que possam auxiliar no combate a essa patologia.

## **1.1 OS PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE NOVOS MEDICAMENTOS**

Por milhares de anos os produtos naturais vêm desempenhando um papel destacado no tratamento e prevenção de doenças humanas em todo o mundo. Medicamentos de produtos naturais são desenvolvidos a partir de diferentes fontes de origem, incluindo animais, plantas e microrganismos (CHIN *et al.*, 2006).

Os produtos naturais são fontes importantes para novos medicamentos, adequados para modificações adicionais durante o desenvolvimento de medicamentos, uma análise da origem dos medicamentos desenvolvidos entre 1981 e 2010 mostrou mais da metade dos medicamentos lançados no mercado eram direta ou indiretamente derivados de produtos naturais, enquanto que apenas 36% dos medicamentos lançados neste período eram puramente sintéticos (NEWMAN e CRAGG, 2020).

A utilização de produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos tem origem nas diversas estruturas e nos intrincados esqueletos de carbono dos produtos naturais. Os metabólitos secundários de fontes naturais são elaborados dentro de sistemas vivos, desta maneira, frequentemente demonstram mais compatibilidade biológica do que moléculas totalmente sintéticas, o que os torna excelentes candidatos para o desenvolvimento de drogas (KOEHN e CARTER, 2005).

Os produtos naturais e suas drogas relacionadas podem ser utilizados no tratamento de uma grande quantidade de doenças humanas, como agentes antibacterianos, anticâncer, anticoagulantes, antiparasitários, entre outras (CHIN *et al.*, 2006). Alguns exemplos de compostos naturais derivados de plantas que se tornaram indispensáveis para a medicina moderna podem são agentes quimioterápicos, por exemplo, Paclitaxel e seus derivados de espécies de Teixo (*Taxus brevifolia*), Vincristina e Vinblastina da Vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), e a camptotecina e seus análogos descobertos na árvore chinesa *Camptotheca acuminata* Decne (KINGHORN *et al.*, 2011).

## **1.2 O GÊNERO *Cymbopogon***

O gênero *Cymbopogon* é composto por 144 espécies e está amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América. Este gênero é reconhecido por possuir alto teor de óleos essenciais que por sua vez vêm sendo usados para uma grande gama de aplicações, que incluem cosméticos, produtos farmacêuticos e perfumaria. Espécies do gênero *Cymbopogon* possuem alto valor comercial, que ainda é potencializado devido à capacidade que estas espécies têm de crescer em condições climáticas moderadas e extremamente severas (AVOSEH *et al.*, 2015).

O uso popular das espécies do gênero *Cymbopogon* é bastante diverso, são relatados, por exemplo, aplicações como chá, suplemento medicinal, repelente de insetos, inseticida, no controle da gripe e como anti-inflamatório e analgésico (AVOSEH *et al.*, 2015). Vários ensaios confirmaram o potencial das espécies *Cymbopogon* para seus diferentes usos como, o potencial

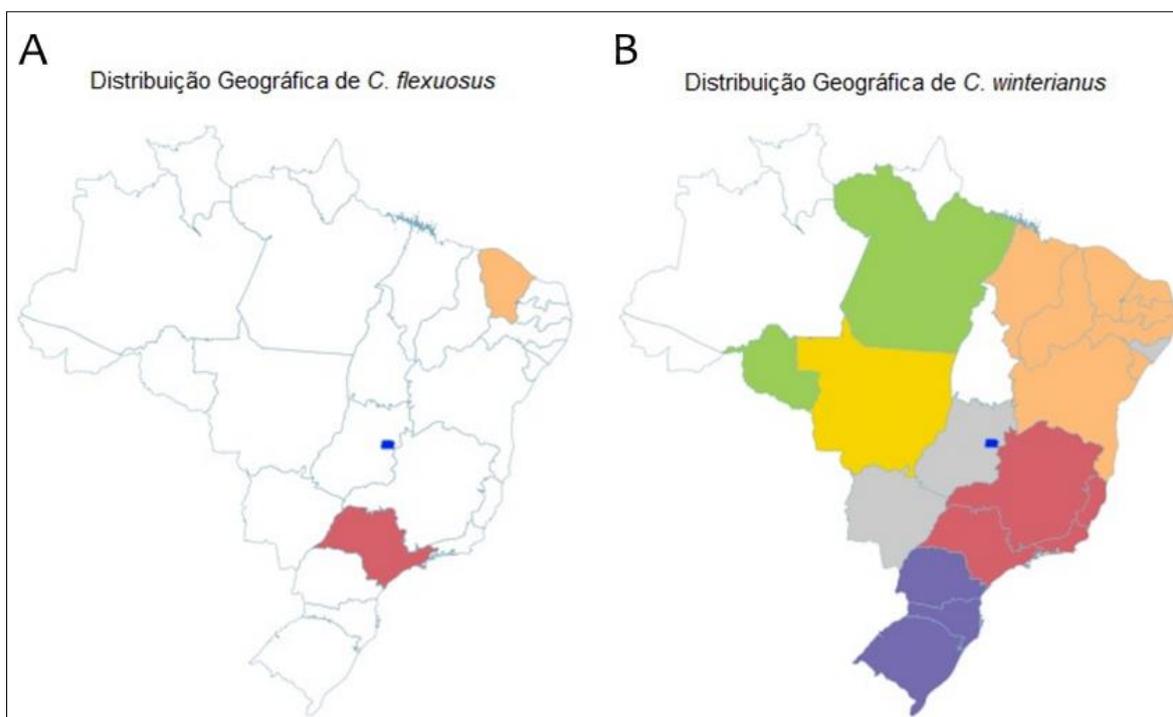
anticonvulsivante de *C. winterianus* (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2008), o potencial anti-hiperalgésico e anti-inflamatório de *C. citratus* (CAMPOS *et al.*, 2019), a atividade antibacteriana de *C. khasianus* (SINGH e KATOCH, 2020), a atividade antifúngica de *C. Martini* (ANGIOLELLA, 2020), dentre outras.

A grande quantidade de informação obtida através dos estudos etnofarmacológicos do gênero *Cymbopogon*, levou ao interesse sobre os constituintes químicos presentes no gênero. Diversos estudos demonstraram a presença de diferentes compostos químicos nas espécies de *Cymbopogon*, foram isolados alcaloides, terpenoides voláteis e não voláteis, flavonoides, carotenoides e taninos de diferentes partes das plantas (AVOSEH *et al.*, 2015). Os compostos de maior destaque nas espécies de *Cymbopogon* são os terpenoides voláteis como o *cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol e *trans-p*-Mentha-1(7),8-dien-2-ol em *C. giganteus*, citronelal e geraniol em *C. winterianus*, citral em *C. flexuosus* e *C. citratus* (AHMAD e VILJOEN, 2015).

### **1.3 *Cymbopogon flexuosus* e *Cymbopogon winterianus***

O *Cymbopogon flexuosus* (Nees) Will. Watson e *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor não são espécies nativas do Brasil, porém são adaptadas e cultivadas no país, pertencem a família *Poaceae* e ao gênero *Cymbopogon*. O *C. flexuosus* é popularmente conhecido como Capim Limão e está presente no Nordeste (Ceará), Centro-Oeste (Distrito Federal) e Sudeste (São Paulo) (Figura 1, A). O *C. winterianus* é popularmente conhecido como Citronela ou Citronela

de Java e está mais amplamente distribuído no Brasil, ocorrendo em todas as regiões do país (Figura 1, B) (FLORA DO BRASIL, 2020).



**Figura 1:** Distribuição geográfica de *C. flexuosus* (A) e *C. winterianus* (B), no Brasil. Adaptado de Flora do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020).

Estudos envolvendo o *C. flexuosus* demonstraram uma série de atividades biológicas como a atividade antifúngica (NARDONI *et al.*, 2019), antimicrobiana (XIAO *et al.*, 2020), anticâncer frente a linhagens de câncer renal e de mama (GAONKAR *et al.*, 2018), estes efeitos estão relacionados ao Citral, o composto majoritário encontrado na espécie. O *C. winterianus* tem como composto majoritário o citronelal (AHMAD e VILJOEN, 2015), algumas propriedades já foram descritas para a espécie como, repelente (EL-HELALY *et al.*, 2020), antimicrobiana (STAUDT *et al.*, 2020), larvicida (MANH *et al.*, 2020) e antifúngica (ALMEIDA *et al.*, 2016).

## 1.4 COMPLEXAÇÃO COM CICLODEXTRINAS

A utilização prática de óleos essenciais e seus compostos majoritários é limitada devido à sua baixa solubilidade em água, por serem compostos hidrofóbicos, e devido à sua baixa estabilidade a agentes ambientais como oxigênio e temperaturas elevadas, sendo altamente voláteis (LU *et al.*, 2018).

As ciclodextrinas (CD) têm sido amplamente utilizadas para melhorar a biodisponibilidade de produtos naturais, como terpenos e óleos essenciais, potencializando a sua aplicação farmacológica (RODRIGUES *et al.*, 2017). As CDs são oligossacarídeos cíclicos na forma de cones truncados, compostos por monômeros de  $\alpha$ -D-glucopiranosose ligados por ligações  $\alpha$ -1,4, sendo as CDs naturais classificados como  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD ou  $\gamma$ -CD, tendo seis, sete ou oito monômeros, respectivamente. Elas têm uma cavidade central hidrofóbica e uma superfície hidrofílica e podem incorporar uma variedade de moléculas para formar complexos hospedeiro-hóspede, resultando em aumento da solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade da molécula hóspede (BREWSTER e LOFTSSON, 2007). Entre as CDs naturais, a  $\beta$ -ciclodextrina é mais utilizada para complexação de fármacos.

## 1.5 O CÂNCER E O FENÔMENO DA RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

Câncer é um termo genérico utilizado para denominar um conjunto de mais de 100 doenças onde o crescimento desordenado de células, que invadem órgãos e tecidos, é um ponto em comum. Estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, devido a sua rápida divisão, culminando com a

formação de tumores, que podem migrar para outras regiões do corpo (INCA, 2020). O câncer desenvolve-se a partir da transformação de células normais em células tumorais em um processo que de forma geral progride de uma lesão pré-cancerosa para um tumor maligno. Essas mudanças resultam da interação entre os fatores genéticos e agentes externos, como por exemplo, carcinógenos físicos, como radiação ultravioleta e ionizante; carcinógenos químicos, como amianto, componentes da fumaça do tabaco; carcinógenos biológicos, como infecções por vírus, bactérias ou parasitas (WHO, 2024).

O câncer acomete anualmente mais de 19 milhões de pessoas e é a segunda principal causa de mortes globalmente, sendo responsável por aproximadamente 9,7 milhões de mortes em 2022 (Tabela 1), segundo dados do *Global Cancer Observatory* (WHO, 2024). Ainda segundo dados do *Global Cancer Observatory*, no Brasil em 2022, foram estimados 627 mil novos casos de câncer. Entre os homens destacam-se os casos de câncer de próstata, cólon e reto, pulmões e estômago. Entre as mulheres destacam-se os casos de câncer de mama, tireoide, cólon e reto e colo do útero. O número de mortos por câncer, no Brasil, gira em torno de 278 mil anualmente (WHO, 2024).

**Tabela 1:** Incidência e Mortalidade do câncer no mundo

Região	Incidência	Mortalidade
África	1.185.216	763.843
América Latina e Caribe	1.551.060	749.242
América do Norte	2.673.174	706.427
Europa	4.471.422	1.986.093
Oceania	269.088	73.776
Asia	9.826.539	5.464.451

**Fonte:** *Global Cancer Observatory*, <https://gco.iarc.fr/today/en>, acessado em 09/2024

Um importante problema observado em relação ao sucesso da quimioterapia no tratamento das neoplasias é o desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos empregados, essa resistência à quimioterapia é responsável pelo insucesso no tratamento. A resistência a múltiplas drogas (MDR) consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos, tanto aos utilizados inicialmente, quanto aqueles empregados como alternativa (HUBER *et al.*, 2010). Uma das características interessantes da MDR é que os quimioterápicos envolvidos no fenômeno de resistência não possuem analogia estrutural nem farmacológica como, por exemplo, em casos onde a vimblastina, que é um alcaloide bisindólico, e a doxorrubicina, que é uma antraciclina, são empregados (DEWICK, 2009). A MDR está relacionada a uma série de fatores que não são plenamente elucidados. Os principais fatores envolvidos são o transporte da droga através da membrana plasmática, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e diminuição da apoptose (QIAN *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2016).

Dentre os fatores envolvidos na MDR, a principal forma de resistência está relacionada com a supra-regulação, na membrana das células de câncer, de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (CHEN *et al.*, 2020). Certos transportadores ABC atuam transportando ativamente os quimioterápicos para fora das células de câncer, é o caso da glicoproteína-P (P-gp), também conhecido como ABCB1, que possui a capacidade de bombear para fora das células de câncer certas drogas antineoplásicas, diminuindo sua concentração e levando a MDR (ZHOU, 2008), outros transportadores ABC tem sido relacionados ao fenômeno de MDR, é o caso do transportador ABCC1, também

conhecido como Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1) (MURAHARI *et al.*, 2017).

## **1.6 O CÂNCER CERVICAL**

Câncer cervical ou câncer de colo do útero é a denominação utilizada para designar o tipo de câncer onde ocorre o desenvolvimento de tumores na cérvix uterina, a extremidade inferior do útero. A desordenada multiplicação do epitélio de revestimento do órgão compromete o órgão em si, bem como possui a capacidade de invadir outros tecidos e órgãos (WHO, 2024). A quase totalidade dos casos de lesões cervicais pré-cancerosas e do câncer cervical (99%) é causada por infecção pelo HPV, o Papilomavírus Humano, um vírus extremamente comum transmitido através do contato sexual (VU, *et al.*, 2018). As infecções por HPV são, na maioria das vezes, subclínicas e transitórias. O HPV possui a capacidade de escapar do sistema imune do hospedeiro e diminuir a imunidade inata, porém, cerca de 90% das mulheres são capazes de eliminar naturalmente a infecção primária por HPV em até dois anos; apenas 1% a 2% das infecções evoluem para câncer cervical crônico. No entanto, em algumas mulheres com infecções persistentes por HPV de alto risco, a possibilidade da infecção evoluir para o estado pré-canceroso aumenta significativamente (DELIGEOROGLOU *et al.*, 2013; MCBRIDE, 2017). Os tipos de HPV com maiores propriedades carcinogênicas, classificados como HPV de alto risco são do tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (PENG *et al.*, 2020).

O HPV infecta células na camada basal do epitélio, provavelmente via microabrasões na superfície epitelial. A Internalização do vírus leva várias horas,

após as quais o DNA viral é liberado do capsídeo e transportado para o núcleo como material genético livre ou epissomas extracromossômicos (CROSBIE *et al.*, 2013). A replicação ocorre apenas em células suprabasais, diferenciadas que são destinadas à maturidade e senescência e, desta maneira, não expressam naturalmente a maquinaria replicativa necessária à sobrevivência do vírus. O HPV contorna esse problema codificando duas proteínas - E6 e E7 - que, juntas, promovem a proliferação celular, prolongam a progressão do ciclo celular e previnem a apoptose, a célula torna-se permissiva à replicação viral e o genoma do HPV passa a ser gerado dentro das células (GHITTONI *et al.*, 2010). Ocorre então a expressão, nas camadas mais superficiais do epitélio, das proteínas do capsídeo - L1 e L2 -, a montagem viral ocorre e, finalmente, novas partículas virais infecciosas (vírions) passam a ser liberadas na superfície epitelial. Este ciclo leva de 2 a 3 semanas, o tempo coincide com aquele necessário para que uma célula cervical migre das camadas basais para as mais superficiais do epitélio, amadureça, passe pela senescência e morra (STANLEY, 2010). Em determinadas infecções por HPV de alto risco, as proteínas E6 e E7 são extremamente eficientes ao bloquear reguladores negativos do ciclo celular, fazendo com que as células infectadas nunca amadureçam, este processo leva a instabilidade genômica, permitindo que as alterações genéticas se acumulem, levando à transformação maligna de uma célula infectada com o HPV em uma célula cancerosa invasiva (CROSBIE *et al.*, 2013).

Mundialmente, o câncer cervical acomete cerca de 662 mil mulheres por ano, sendo o quarto câncer de maior incidência e a quarta maior causa de mortes entre os casos de câncer que acometem mulheres, sendo responsável por aproximadamente 348 mil de mortes em 2022 (WHO, 2024). Segundo dados do

*Global Cancer Observatory*, no Brasil em 2022, ocorreram, aproximadamente, 18 mil novos casos de câncer cervical e por volta de 9 mil mortes por câncer cervical no Brasil (WHO, 2024). O fenômeno de MDR também é observado no câncer cervical, a superexpressão da glicoproteína P já foi bem estabelecida como um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da MDR no câncer cervical (WAGNER *et al.*, 2017), além disso em outros transportadores ABC, como o ABCC1, já foi demonstrado um papel central no desenvolvimento da MDR no câncer cervical (MURAHARI *et al.*, 2017).

Desta forma a necessidade de novos quimioterápicos que sejam eficientes e seguros para o tratamento do câncer cervical.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o potencial antiproliferativo dos óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C. winterianus* e seus compostos majoritários, frente a linhagem de câncer cervical HeLa.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar os compostos dos óleos essenciais através da CG-MS

Complexar e caracterizar o Citral e Citronelal com  $\beta$ -ciclodextrina

Analisar a atividade metabólica através do ensaio de MTT

Analisar a migração celular através do ensaio Wound Healing

Analisar o ciclo celular por citometria de fluxo

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAIS E REAGENTES**

Óleos essenciais de *C. flexuosus* (CF) e *C. winterianus* (CW) foram obtidos da empresa Entrefolhas Óleos Essenciais e Cosméticos (Rio de Janeiro, Brasil), Citral e Citronelal foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich® (San Luis, Missouri, EUA), soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina e meio de cultura DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) foram obtidos da Cultilab® (Campinas, Brasil). MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi obtido da Thermo Fisher® (Massachusetts, EUA). Fauldoxo (Doxorrubicina) foi obtido da Libbs Farmacêutica (São Paulo, Brasil).

#### **3.2 CULTURA CELULAR**

As linhagens celulares HeLa (adenocarcinoma cervical) e NIH-3T3 (fibroblastos murinos não-tumorais) foram gentilmente cedidas pelo CEMIB-UNICAMP. Todas as linhagens foram cultivadas em estufa incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando-se meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina.

### **3.3 ANÁLISE DE AMOSTRA POR CROMATOGRAFIA A GÁS / ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC/MS)**

As soluções dos óleos essenciais a serem analisados, foram preparadas em concentrações de 10 mg mL<sup>-1</sup>, utilizando Tetraidrofurano destilado como solvente de diluição. A análise foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás (GC/MS da Thermo Scientific, Bremen, Germany), modelo TRACE 1310 / espectrômetro de massas modelo TSQ-9000, com o autoamostrador TriPlus RSH sob as seguintes condições cromatográficas de análise: Coluna NA-5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano), dimensões da coluna: 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme, programação do forno: 50 °C (5 min); 5 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C (10 min), gás de arraste e fluxo: Hélio / 1 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção/Split: 1 µL / 1:50 (Split), temperatura do injetor: 280 °C, temperatura da interface: 280 °C, temperatura da fonte de íons: 300 °C, ionização por elétrons: 70 eV e tempo de análise: 61 min. Os dados foram adquiridos no modo de varredura (SCAN) na faixa de m/z de 40 a 550 Da, e corte do solvente feito a 5,5 min. A caracterização dos óleos e a atribuição dos dados foi realizada a partir do software Thermo Scientific Chromeleon Chromatography Data System (CDS) (versão 7.2.10), e os compostos foram identificados experimentalmente por comparação dos espectros, com os bancos de dados da biblioteca espectral NIST 05 e com base na comparação dos índices de retenção dos compostos, calculados a partir de um padrão de n-alcenos de C<sub>7</sub> a C<sub>24</sub>, com os índices disponíveis na literatura.

### **3.4 COMPLEXAÇÃO DAS AMOSTRAS COM $\beta$ -CICLODEXTRINA**

#### **3.4.1 OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM $\beta$ -CICLODEXTRINA**

A obtenção dos complexos de inclusão foi realizada por mistura física (MF), e co-evaporação (CoE). A proporção molar 1:1 citronelal:  $\beta$ -ciclodextrina foi empregada. A MF consistiu na simples mistura mecânica em gral com auxílio de pistilo sem adição de solvente. O complexo CoE foi preparado por meio de adição de 8 mL de água destilada a um almofariz e a mistura foi submetida à uma agitação magnética constante de 400 rpm, durante 36 horas e após, mantida por 24h em temperatura ambiente para completa evaporação da água. Ao término a amostra foi macerada com auxílio de gral e pistilo e após transferida para o dessecador para remoção de toda umidade. Todas as amostras foram acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados e armazenadas em dessecador sob temperatura ambiente.

#### **3.4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO - ANÁLISE TÉRMICA**

As curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) (DSC 2010 TA Instruments) foram geradas usando uma faixa de temperatura de 25 - 500 °C, sob atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>), uma taxa de fluxo de gás de 50 mL.min<sup>-1</sup> e uma temperatura de 10 °C min<sup>-1</sup> taxa de aquecimento. O porta-amostra feito de alumínio continha 2 mg de amostra. As curvas termogravimétricas (TG/DTG) foram obtidas no analisador Shimadzu TG-60 com temperatura variando de 25 a 900 °C, sob atmosfera (N<sub>2</sub>), vazão de gás de 50 mL.min<sup>-1</sup> e 10 °C min<sup>-1</sup> de

taxa de aquecimento. As análises foram realizadas utilizando um porta-amostra de platina contendo 7 mg da amostra.

### 3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO

#### 3.5.1 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT

O ensaio de viabilidade celular de MTT é um método amplamente utilizado para avaliar a viabilidade e a proliferação celular. Este ensaio é baseado na capacidade das células vivas de reduzir o brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a formazan, um composto arroxeadado.

O MTT é um corante amarelo solúvel que atravessa a membrana celular e é captado pelas células vivas. Uma vez dentro das células, o MTT é reduzido pelas enzimas mitocondriais em cristais de formazan roxos. Esse processo é um indicador da atividade metabólica das células, que está diretamente relacionada à viabilidade celular. Células viáveis e metabolicamente ativas são capazes de converter o MTT, enquanto células mortas ou danificadas não têm essa capacidade.

**Procedimento:** Células HeLa e fibroblastos NIH-3t3 foram semeados em placas de 96 poços, na concentração de  $3,5 \times 10^4$  células por mL, 100  $\mu$ L por poço em meio DMEM, 10% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina, incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após as 24 horas de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações, variando entre 0,78 e 50 $\mu$ g/mL, dos óleos essenciais de *C. flexuosus* (CF) e *C. winterianus* (CW), Citral (CI), Citronelal (CO) puros e complexados com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CI e  $\beta$ -CO). O controle positivo utilizado foi a Doxorrubicina (DOX) em concentrações variando

entre 0,23 e 15  $\mu\text{g/mL}$ , células tratadas apenas com DMEM suplementado foram consideradas como o controle negativo. As células foram novamente incubadas, por 48 horas, em seguida o meio foi removido e 100  $\mu\text{l}$  de MTT (0,5 mg/ml) diluído em meio DMEM puro foi aplicado, após 4 horas de incubação o meio foi removido e os cristais de formazan solubilizados com 100  $\mu\text{l}$  de DMSO (Dimetilsulfóxido). As placas foram agitadas mecanicamente até a completa solubilização dos cristais e então lidas em espectrofotômetro (Epoch, Biotek Instruments<sup>®</sup>) a 570 nm. As absorbâncias obtidas foram analisadas por regressão não-linear em curva de dose-resposta do Log do (inibidor) x resposta normalizada, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 8.0 <sup>®</sup> (Intuitive Software for Science, EUA), resultando na obtenção dos valores de IC<sub>50</sub> (Concentração inibitória de 50%). Os ensaios foram realizados em triplicatas e 3 experimentos independentes.

### **3.4.2 ÍNDICE DE SELETIVIDADE**

O índice de seletividade (IS) é um parâmetro crucial na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos anticâncer, refletindo a capacidade de um composto de agir preferencialmente sobre células cancerosas em relação às células normais. Este índice ajuda a determinar a eficácia e a segurança de um fármaco, e é uma consideração vital para garantir que os tratamentos não apenas combatam o câncer de forma eficaz, mas também minimizem danos aos tecidos saudáveis. O índice de seletividade é definido como a razão entre a concentração do fármaco necessária para causar um efeito desejado em células

cancerosas e a concentração necessária para causar um efeito semelhante em células normais. Em termos matemáticos, é expresso como:  $IS = \frac{IC_{50}^{não\ tumoral}}{IC_{50}^{tumoral}}$ .

### 3.4.3 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – *WOUND HEALING ASSAY*

O ensaio de cicatrização de feridas (*wound healing assay*) é um método amplamente utilizado para investigar o efeito de compostos em processos de migração, críticos para importantes processos do câncer, como a invasão e metástase. Embora tradicionalmente associado ao estudo da cicatrização de feridas, esse ensaio tem se mostrado valioso em pesquisas anticâncer devido à sua capacidade de modelar e analisar aspectos relacionados ao comportamento celular tumoral.

O ensaio de cicatrização de feridas envolve a criação de uma "ferida" artificial em uma cultura de células, geralmente usando uma técnica de raspagem ou um dispositivo de "scratch". Após a criação da ferida, as células são incubadas na presença do composto a ser testado e fotografada em determinados intervalos de tempo. O objetivo é observar como as células preenchem a área da ferida ao longo do tempo, o que pode refletir a capacidade do composto de influenciar a migração e a proliferação celular.

**Procedimento:** Células HeLa foram semeadas em placas de 24 poços, na concentração de  $8 \times 10^4$  células por mL, 1 mL por poço em meio DMEM, 10% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina, incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas o meio foi removido e os poços lavados com PBS (solução salina tamponada com fosfato), após a remoção do PBS, 1mL de

meio DMEM, 0,2% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina foi adicionado em cada um dos poços, as células foram novamente incubadas por 24 horas. Quando as células atingiram uma monocamada confluyente, um risco foi realizado na monocamada utilizando uma ponteira de 1.000 µL estéril, cada um dos poços foi lavado 3 vezes com PBS estéril para remoção dos debris resultantes da realização do risco. Os tratamentos foram preparados em meio DMEM, 0,2% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina, com o objetivo de minimizar a proliferação celular. Os riscos foram então fotografados no mesmo ponto da placa, nos tempos 0, 12, 18, 24, 36 e 48 h. As fotos foram analisadas no programa FIJI/ImageJ, com o plugin Wound\_healing\_size\_tool. A concentração das amostras testadas foi equivalente à metade dos valores de IC<sub>50</sub>, previamente obtidos nos ensaios de MTT. O controle negativo recebeu apenas o meio DMEM, 0,2% SFB e 1% de penicilina/estreptomicina.

A redução da área livre de migração foi avaliada em comparação com cada risco no tempo 0. A análise estatística foi realizada através de ANOVA seguido pelo teste de Dunnet, comparando o percentual de área livre de migração dos riscos dos compostos testados com o grupo controle negativo.

#### **3.4.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO - CÉLULAS HeLa**

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio (PI) é uma técnica amplamente empregada para estudar a distribuição das células em diferentes fases do ciclo celular. O iodeto de propídio é um corante fluorescente que se liga ao DNA e permite a quantificação do conteúdo de DNA em cada célula, fornecendo informações detalhadas sobre a progressão

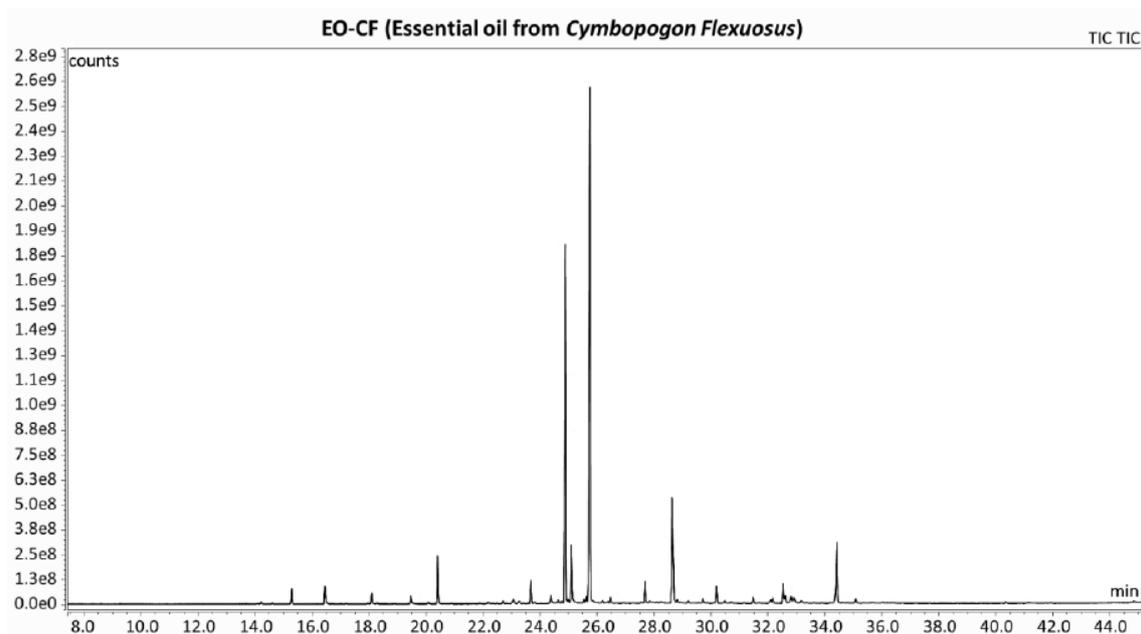
e a fase do ciclo celular. O ciclo celular é dividido em várias fases: G0/G1, S, G2/M. Cada fase é caracterizada por um conteúdo específico de DNA. A análise com iodeto de propídio permite a separação das células com base na quantidade de DNA, identificando assim a fase do ciclo em que as células se encontram.

**Procedimento:** Células HeLa foram semeadas em placas de 6-poços na concentração de  $10^5$  células por mL, 2 mL por cada poço e incubadas por 24h. Os poços foram então lavados com PBS e um novo meio DMEM sem soro fetal bovino foi adicionado a fim de sincronizar o ciclo celular, após 24h em sincronização, o meio foi removido e os tratamentos aplicados em concentrações equivalentes aos valores de  $IC_{50}$ , por 48h. Células tratadas com meio DMEM, 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina foram consideradas como controle negativo. Após as 48 horas de tratamento o sobrenadante foi coletado, em seguida as células aderidas foram coletadas por tripsinização, centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 200  $\mu$ L de PBS. Em seguida as células foram fixadas com 1,8 mL de etanol 70% gelado e congeladas até o momento da leitura no citômetro. As células foram centrifugadas, lavadas com PBS, novamente centrifugadas e ressuspensas em solução de iodeto de propídio (50  $\mu$ g/mL de iodeto de propídio, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100 em PBS). 10.000 eventos foram analisados por citometria de fluxo em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus para que seja avaliado os padrões do ciclo celular. Os histogramas das amostras serão analisados através do programa BD CellQuest™ Pro. As análises foram feitas em colaboração com a Professora Dr<sup>a</sup> Raquel Castiglione do Departamento de Ciências Fisiológicas da UERJ.

## 4. RESULTADOS

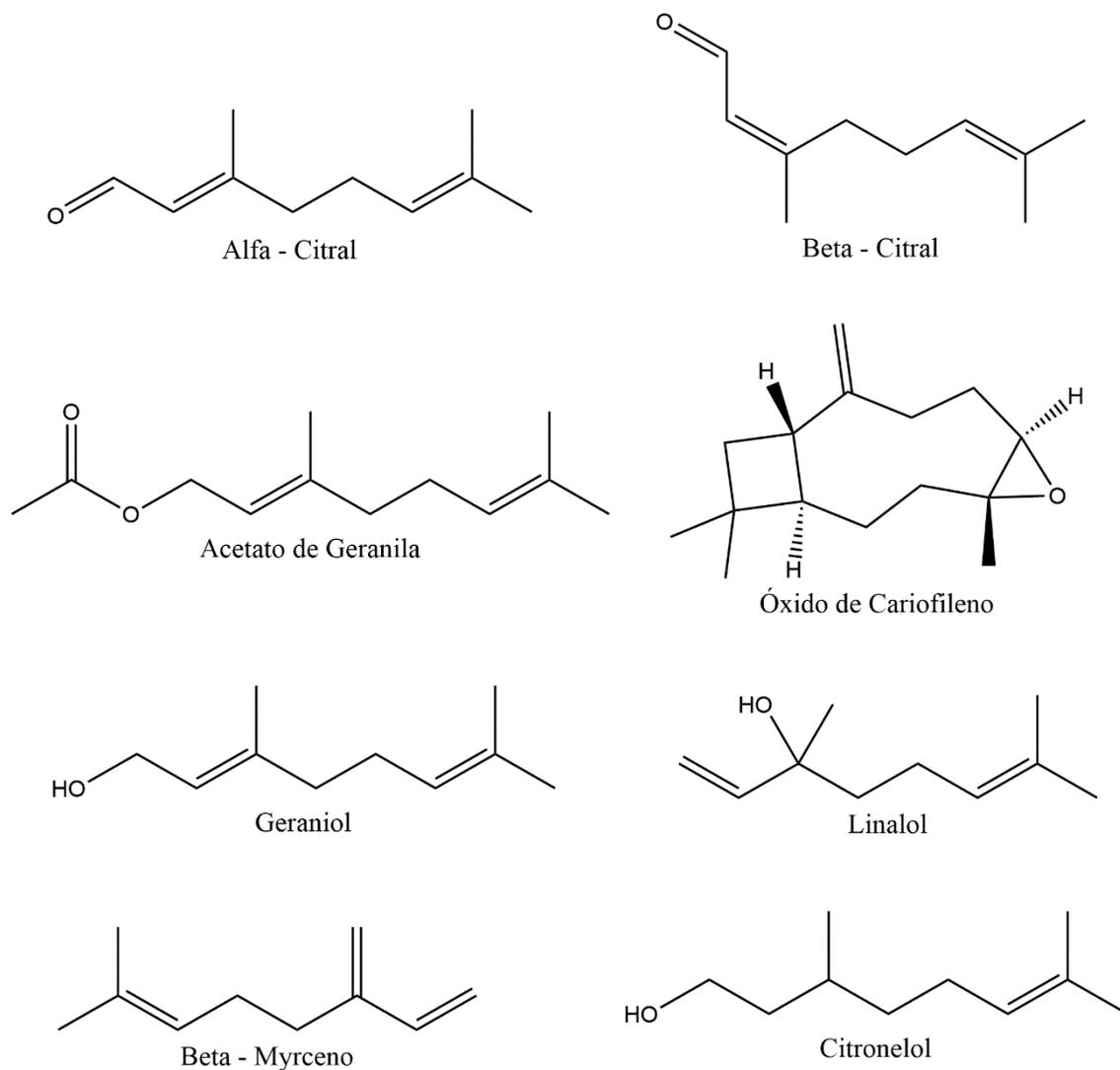
### 4.1. ANÁLISE DE AMOSTRA POR CROMATOGRAFIA A GÁS / ESPECTROMETRIA DE MASSAS MODO SCAN (GC/MS)

O cromatograma obtido após a análise de GC/MS da amostra de *C. flexuosus* está ilustrado na figura 2, é possível observar dois picos em destaque nos tempos de retenção 24,890 e 25,750 que correspondem ao  $\beta$ -Citral e  $\alpha$ -Citral, respectivamente.



**Figura 2:** Cromatograma do óleo essencial de *C. flexuosus*

Foram anotadas 27 diferentes substâncias, compreendendo 99,57% do total da amostra (Tabela 2). Os componentes majoritários encontrados na amostra foram o Citral (70,19%) (Alfa e Beta), seguido pelo Acetato de Geranila (9,53%), Óxido de Cariofileno (4,67%), Geraniol (3,83%) e pelo Linalol (2,99%). Também foram anotadas diversas outras substâncias como o  $\beta$ -Mirceno, Citronelol (Figura 3).



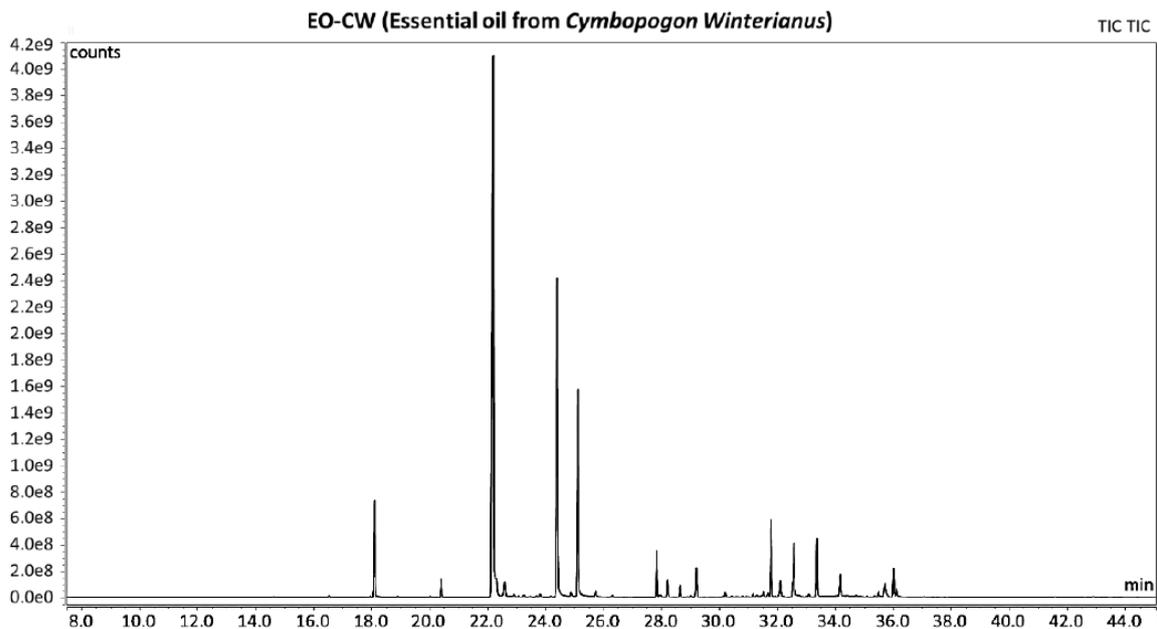
**Figura 3:** Estruturas químicas de substâncias identificadas no óleo essencial de *C. flexuosus*.

**Tabela 2:** Compostos identificados na amostra de *C. flexuosus* por GC/MS

Composto	Tempo de Retenção	IR Experimento	IR Literatura	Área Relativa %
Triciclono	14,210	929	928	0,14
$\alpha$ -Pineno	14,600	940	940	0,10
Canfeno	15,290	959	959	0,96
Sulcatona	16,450	991	986	1,04
$\beta$ -Mirceno	16,540	993	993	0,05
o-Cymeno	17,960	1034	1027	0,06
Limoneno	18,100	1038	1036	0,66

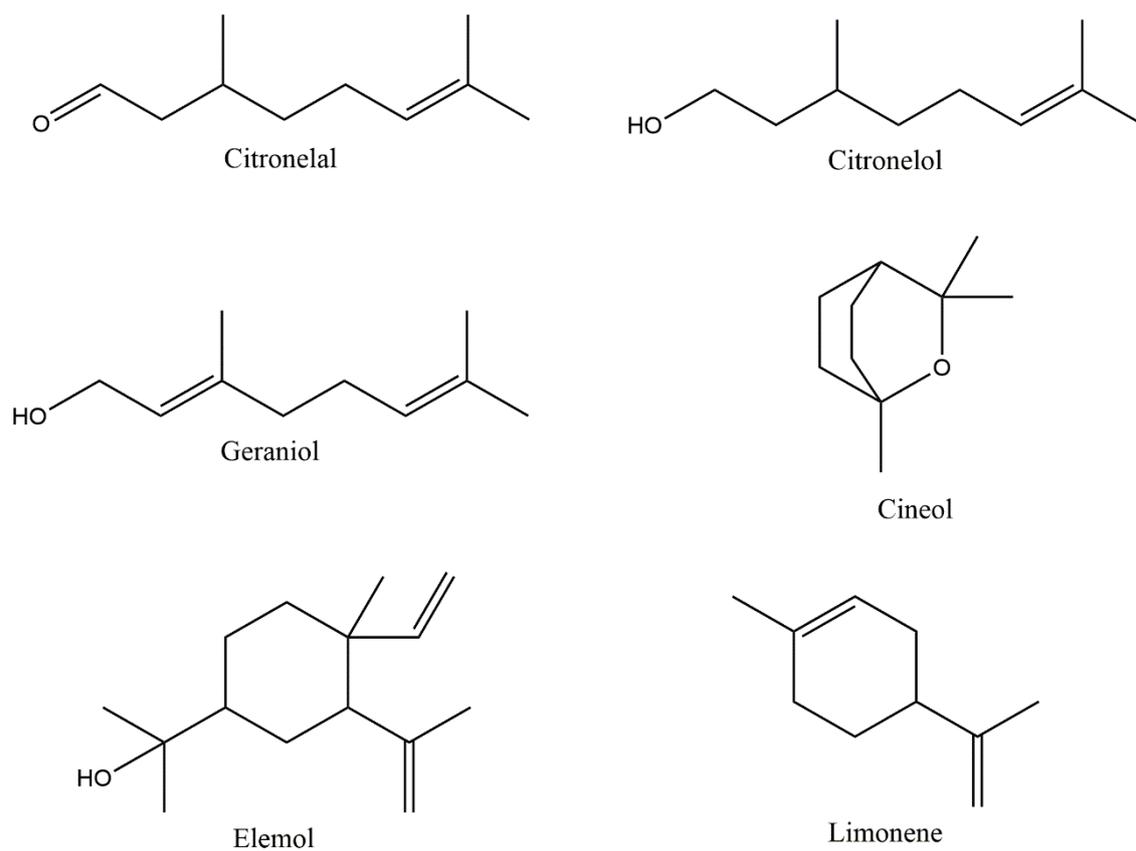
Cineol	18,330	1045	1046	0,08
Terpinoleno	20,080	1094	1093	0,09
Linalol	20,400	1105	1107	2,99
Citronelal	22,190	1160	1154	0,06
p-Mentan-3-ona	22,480	1169	1166	0,06
Borneol	23,060	1187	1186	0,12
$\alpha$ -Terpineol	23,680	1207	1200	1,45
Citronelol	24,380	1231	1236	0,44
$\beta$ -Citral	24,890	1249	1249	26,52
Acetato de Linalila	24,990	1252	1252	0,16
Geraniol	25,100	1256	1255	3,83
Piperitone	25,540	1271	1268	0,16
$\alpha$ -Citral	25,750	1278	1278	43,67
Formato de Geranila	26,480	1303	1309	0,36
Acetato de Geranila	28,640	1381	1383	9,53
$\beta$ -Elemeno	29,200	1401	1403	0,16
Cariofileno	30,200	1439	1438	1,06
$\alpha$ -Cariofileno	31,150	1476	1474	0,06
$\gamma$ -Cadineno	32,530	1531	1534	1,09
Óxido de Cariofileno	34,410	1609	1613	4,67

Para a amostra de *C. winterianus*, o cromatograma obtido após a análise de GC/MS está ilustrado na figura 4, onde pode ser observado 3 picos em destaque, nos tempos de retenção 22,190, 24,400 e 25,120, correspondendo respectivamente ao Citronelal, Citronelol e Geraniol.



**Figura 4:** Cromatograma do Óleo essencial de *C. winterianus*

Foram anotadas 37 diferentes substâncias, compreendendo 98,86% do total da amostra (Tabela 3). Os componentes majoritários encontrados na amostra foram o Citronelal (38,89%), seguido pelo Citronelol (20,36%) e pelo Geraniol (11,89%). Foram também anotadas diferentes outras substâncias, dentre elas o Cineol, Elemol e o Limoneno em percentuais que variavam de 0,03% a 4,89% (Figura 5).



**Figura 5:** Estruturas químicas de substâncias identificadas no óleo essencial de *C. winterianus*.

**Tabela 3:** Compostos anotados na amostra de *C. winterianus* por GC/MS

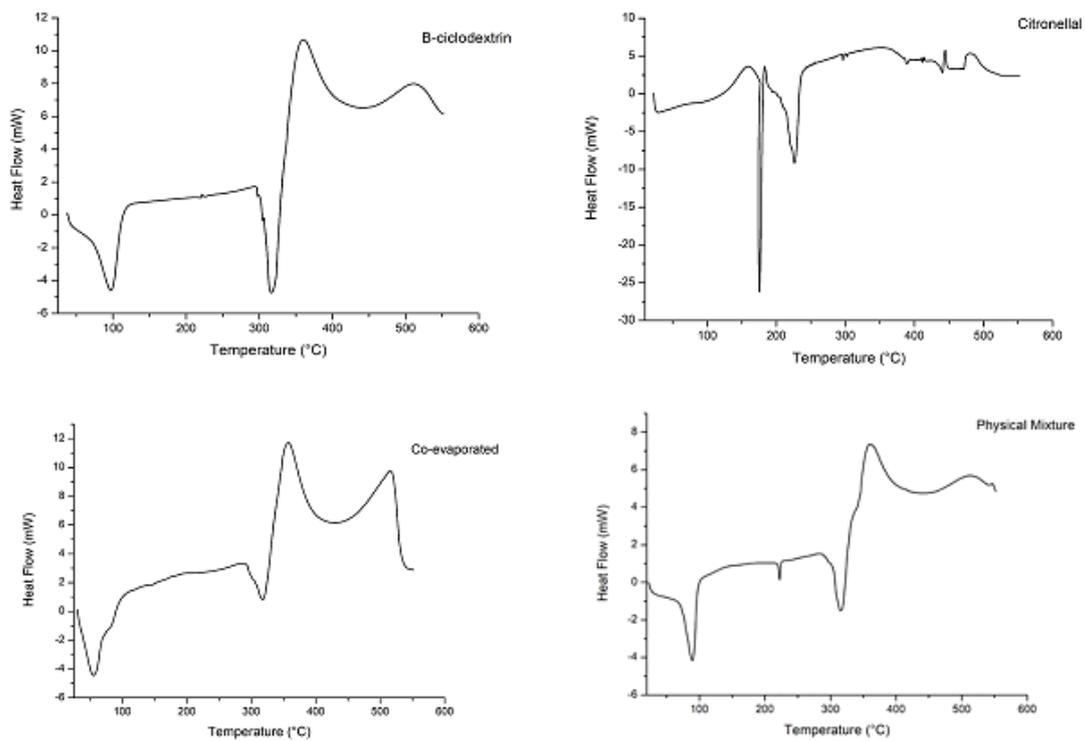
Composto	Tempo de Retenção	IR Experimento	IR Literatura	Área Relativa %
$\alpha$ -Pirreno	14,590	940	940	0,05
$\beta$ -Mirceno	16,530	993	993	0,08
o-Cimeno	17,950	1034	1027	0,07
Limoneno	18,100	1038	1036	4,89
$\beta$ -cis-Ocimeno	18,200	1041	1044	0,07
Cineol	18,330	1045	1046	0,03
$\gamma$ -Terpineno	19,090	1067	1064	0,03
Terpinoleno	20,020	1094	1093	0,07
Linalol	20,400	1105	1107	0,86
Citronelal	22,190	1160	1154	38,89

Isopulegol	22,590	1172	1167	0,92
Isomentol	22,920	1183	1182	0,13
Borneol	23,070	1187	1186	0,04
Terpinen-4-ol	23,250	1193	1192	0,11
$\alpha$ -Terpineol	23,680	1207	1200	0,08
Decanal	23,810	1212	1218	0,13
D-Verbenona	24,200	1225	1228	0,05
Citronelol	24,400	1232	1236	20,36
$\beta$ -Citral	24,880	1248	1249	0,15
Geraniol	25,120	1257	1255	11,89
$\alpha$ -Citral	25,800	1278	1278	0,25
Acetato de bornila	26,300	1297	1297	0,8
Acetato de citronelila	27,840	1352	1349	2,22
Eugenol	28,200	1365	1365	0,81
Acetate de Geranila	28,640	1381	1383	0,50
$\beta$ -Elemeno	29,200	1401	1403	1,48
Cariofileno	30,200	1439	1438	0,17
$\alpha$ -Cariofileno	31,150	1476	1474	0,13
$\gamma$ -Muuroleno	31,520	1490	1485	0,18
Germacreno D	31,780	1500	1503	3,98
$\alpha$ -Muuroleno	32,100	1513	1517	0,94
$\gamma$ -Cadineno	32,570	1531	1534	3,38
Elemol	33,350	1565	1557	2,88
Globulol	34,160	1598	1591	1,11
Cubenol	35,370	1651	1648	0,07
Cadinol	35,730	1667	1660	0,36
$\alpha$ -Cadinol	36,000	1679	1670	1,42

---

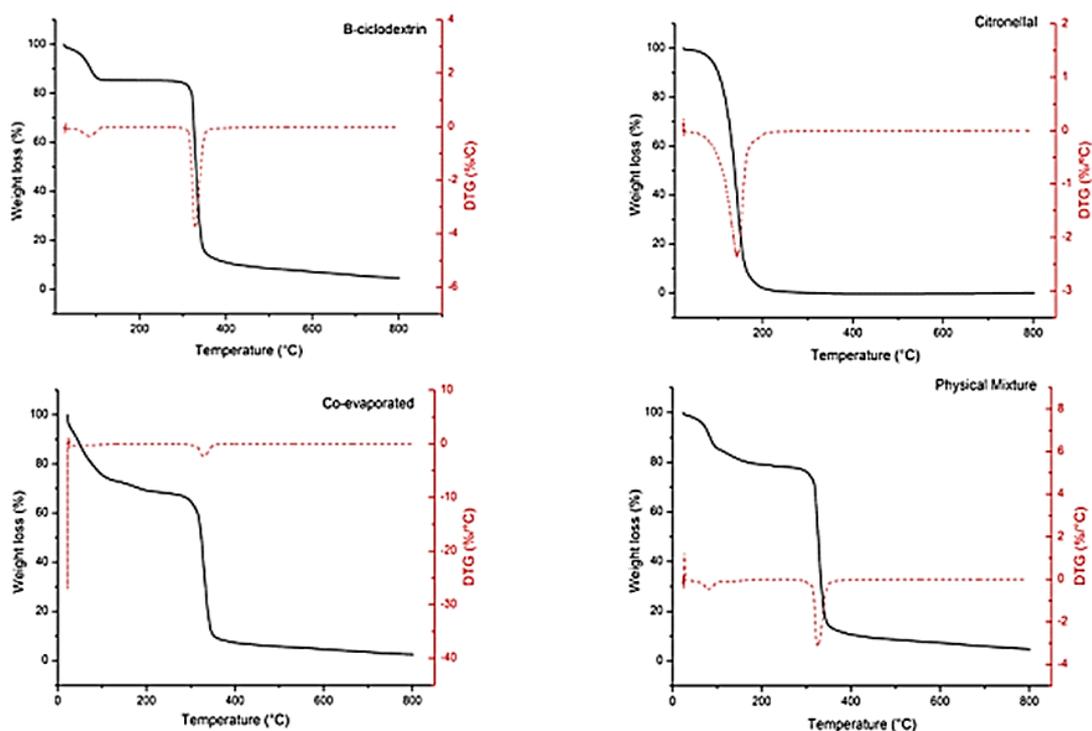
## 4.2 ANÁLISE TÉRMICA DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO $\beta$ -CICLODEXTRINA - CITRONELAL

A curva DSC para  $\beta$ -ciclodextrina mostrou um evento endotérmico em aproximadamente 96°C, que está associado à perda de água dentro da cavidade da molécula. Além disso, outro evento endotérmico seguido de exotérmico foi observado a 316°C, esses eventos estão relacionados à fusão seguida pela degradação da  $\beta$ -ciclodextrina. O termograma DSC do citronelal apresentou eventos endotérmicos entre 176,99 - 182,36°C, o que está relacionado ao processo de volatilização do composto puro, este pico é fundamental para a compreensão do processo de complexação com a  $\beta$ -ciclodextrina. Tanto para as amostras de CoE quanto de MF, foi possível observar comportamento semelhante ao da  $\beta$ -Ciclodextrina. Entretanto, a MF apresentou um leve pico endotérmico entre a faixa de 200°C e 250°C, possivelmente relacionado à molécula citronelal na mistura. Os perfis DSC dos componentes puros (Citronelal e  $\beta$ -CD) e do complexo (citronelal:  $\beta$ -CD) estão ilustrados na Figura 6.



**Figura 6:** Perfis DSC de  $\beta$ -ciclodextrina, Citronelal e complexo de inclusão citronelal: $\beta$ -ciclodextrina, CoE e MF.

As curvas TG/DTG do citronelal revelaram uma perda significativa de massa no primeiro evento ( $\Delta m$  92,3%) iniciando em 54,14°C e terminando em aproximadamente 171°C, este evento está relacionado à volatilização do óleo, a figura 7 mostra as curvas TG/DTG.



**Figura 7:** Curvas TG-DTG de  $\beta$ -ciclodextrina, Citronelal e complexo de inclusão preparado por CoE e MF.

Para o termograma da  $\beta$ -ciclodextrina foi possível observar dois eventos de perda de massa, o primeiro evento ocorrido a 63°C terminou em 118°C ( $\Delta m$  14%), este evento está associado à desidratação da  $\beta$ -ciclodextrina. Outro evento observado foi a 310°C terminando em aproximadamente 359°C ( $\Delta m$  85,64%), relacionado à decomposição da  $\beta$ -ciclodextrina. A análise do termograma de MF e CoE mostra a presença de dois eventos, um comportamento semelhante ao da  $\beta$ -ciclodextrina. O resultado do CoE iniciou seu primeiro evento com temperatura de 54°C, enquanto a MF iniciou em 66,33°C, com ambos os eventos terminando perto de 127°C ( $\Delta m$  17% MF e 27%

CoE). Este evento térmico possivelmente está relacionado à desidratação da  $\beta$ -ciclodextrina presente nas amostras e à volatilização do óleo. Porém, esse evento relacionado à desidratação/volatilização evidenciou a formação de um complexo, portanto pode-se supor que a água da cavidade, presente na  $\beta$ -ciclodextrina, foi substituída por moléculas de citronelal. Outro evento observado para MF e CoE iniciou em temperaturas de 308,39°C para CoE e 307°C para MF, terminando em aproximadamente 358,32°C para CoE e 350°C para MF com  $\Delta m$  de 90,5% e 86%, respectivamente.

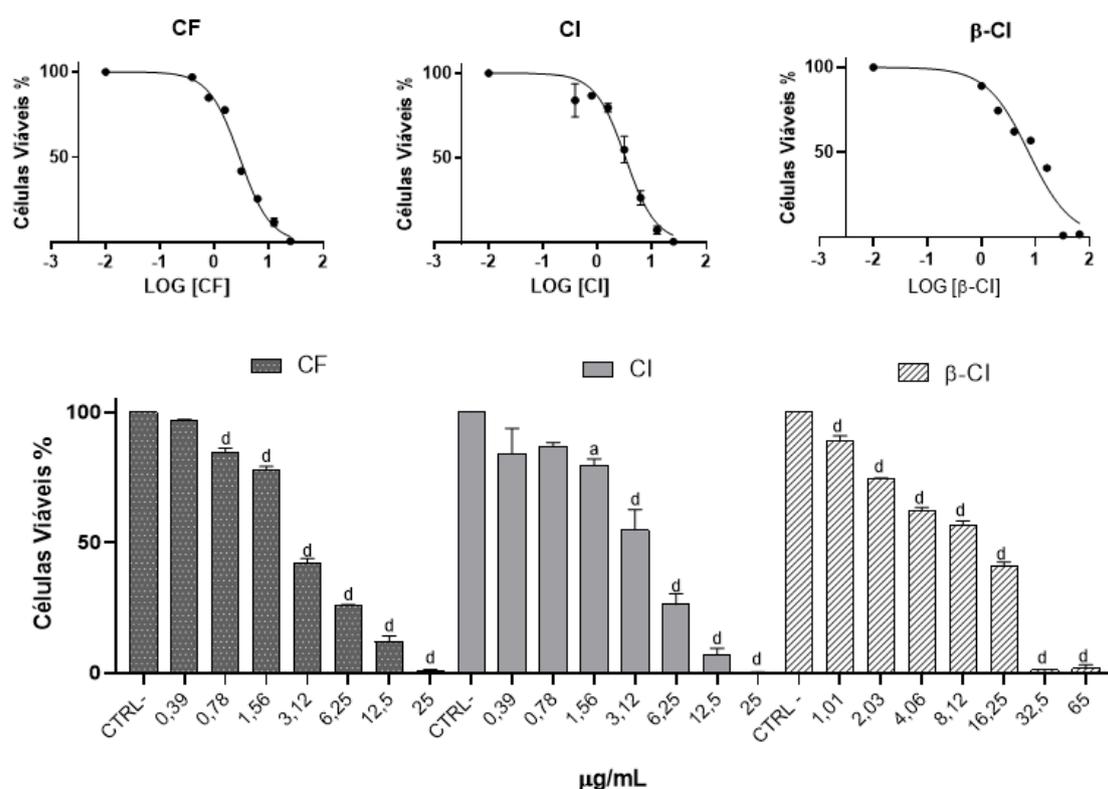
### **4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT**

De forma a avaliar a viabilidade das células HeLa após o tratamento com os óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C. winterianus*, Citral e Citronelal puros e complexados com  $\beta$ -ciclodextrina, foi empregado o ensaio de MTT.

Após 24 horas de tratamento com o óleo essencial de *C. flexuosus*, Citral puro e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina, foi demonstrada atividade citotóxica frente a linhagem celular HeLa. O óleo essencial de *C. flexuosus* demonstrou citotoxicidade a partir de concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$ , e o valor de  $\text{IC}_{50}$  obtido foi de 2,9  $\mu\text{g/mL}$ . A amostra de Citral puro também mostrou-se citotóxica contra células HeLa, concentrações tão baixas quanto 1,56  $\mu\text{g/mL}$  já se mostraram significantes, o  $\text{IC}_{50}$  obtido foi de 3,2  $\mu\text{g/mL}$ . Para a amostra de Citral complexado com  $\beta$ -ciclodextrina o valor de  $\text{IC}_{50}$  obtido foi de 7,4  $\mu\text{g/mL}$ , surpreendentemente superior ao encontrado para o Citral pruro, concentrações a partir de 1,01  $\mu\text{g/mL}$  já mostraram diferença significativa quando comparadas ao controle negativo. As

curvas dose-resposta e gráficos de viabilidade celular estão ilustrados na figura

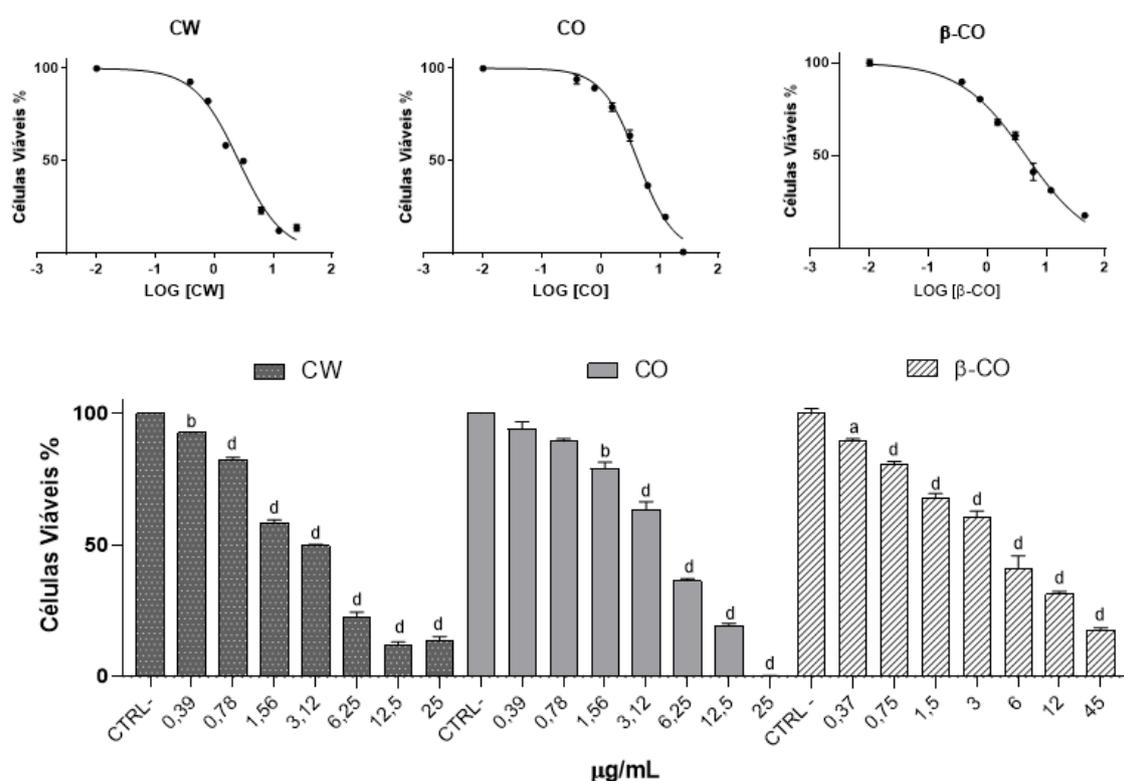
8.



**Figura 8:** Ensaio de viabilidade celular de MTT, em células HeLa (*C. flexuosus*, Citral e Citral complexado). Curvas dose-resposta e gráfico de viabilidade celular. Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias e pós teste de Dunnet e são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. DMEM 10% SFB foi utilizado como controle negativo.

A viabilidade das células HeLa foi avaliada após 24 horas de tratamento com o óleo essencial de *C. winterianus*, Citronelal puro e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina. As amostras testadas se mostraram citotóxicas, um valor de  $IC_{50}$  de 2,5  $\mu$ g/mL foi obtido para o óleo essencial de *C. winterianus*, e concentrações a partir de 0,39  $\mu$ g/mL foram suficientes para produzir diferença quando comparado ao controle negativo. O citronelal puro e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina também foi citotóxico contra as células HeLa. Valores de  $IC_{50}$  de 4,2  $\mu$ g/mL e 4,5  $\mu$ g/mL foram obtidos, respectivamente, para a amostra de Citronelal

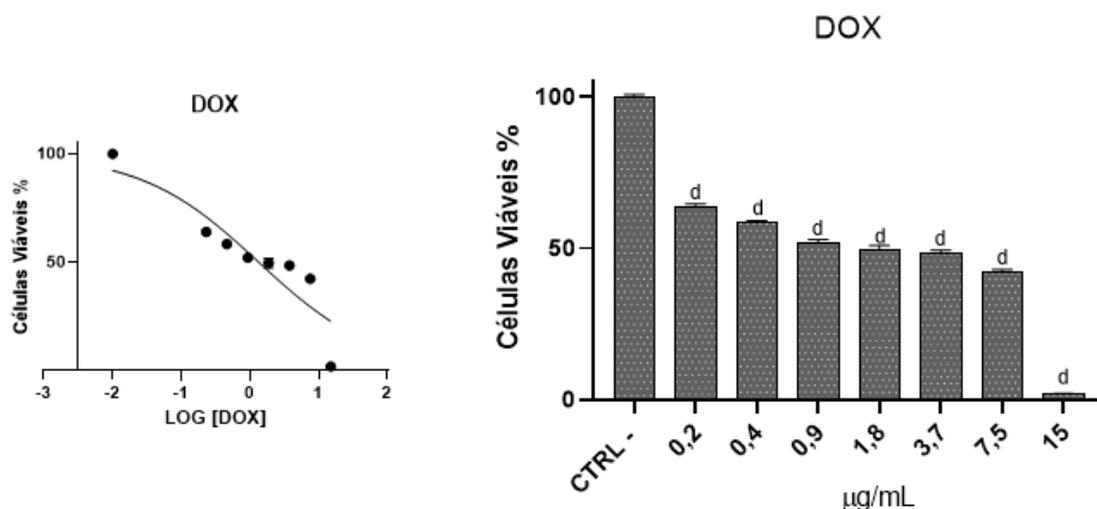
puro e Citronelal complexado. A partir de concentração de 1,56  $\mu\text{g/mL}$  já foram observados efeitos significativos, quando comparado ao controle negativo, para a amostra de Citronelal. A amostra de Citronelal complexada com  $\beta$ -ciclodextrina foi capaz de produzir efeito na viabilidade celular a partir de concentrações tão baixas quanto 0,37  $\mu\text{g/mL}$ . As curvas dose-resposta e gráfico de viabilidade celular relativos ao óleo de *C. winterianus*, Citronelal puro e complexado, estão ilustrados na figura 9.



**Figura 9:** Ensaio de viabilidade celular de MTT em células HeLa (*C. winterianus*, Citronelal e Citronelal complexado). Curvas dose-resposta e gráfico de viabilidade celular. Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias e pós teste de Dunnet e são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. DMEM 10% SFB foi utilizado como controle negativo.

A viabilidade das células HeLa também foi avaliada quando tratadas com o Cloridrato de Doxorrubicina, que se mostrou eficiente ao produzir diminuição da viabilidade celular em concentrações a partir de 0,2  $\mu\text{g/mL}$  e valor de  $\text{IC}_{50}$

de 1,3  $\mu\text{g/mL}$ , a curva dose-resposta e gráfico de viabilidade celular após o tratamento com a Doxorrubicina estão ilustrados na figura 10.

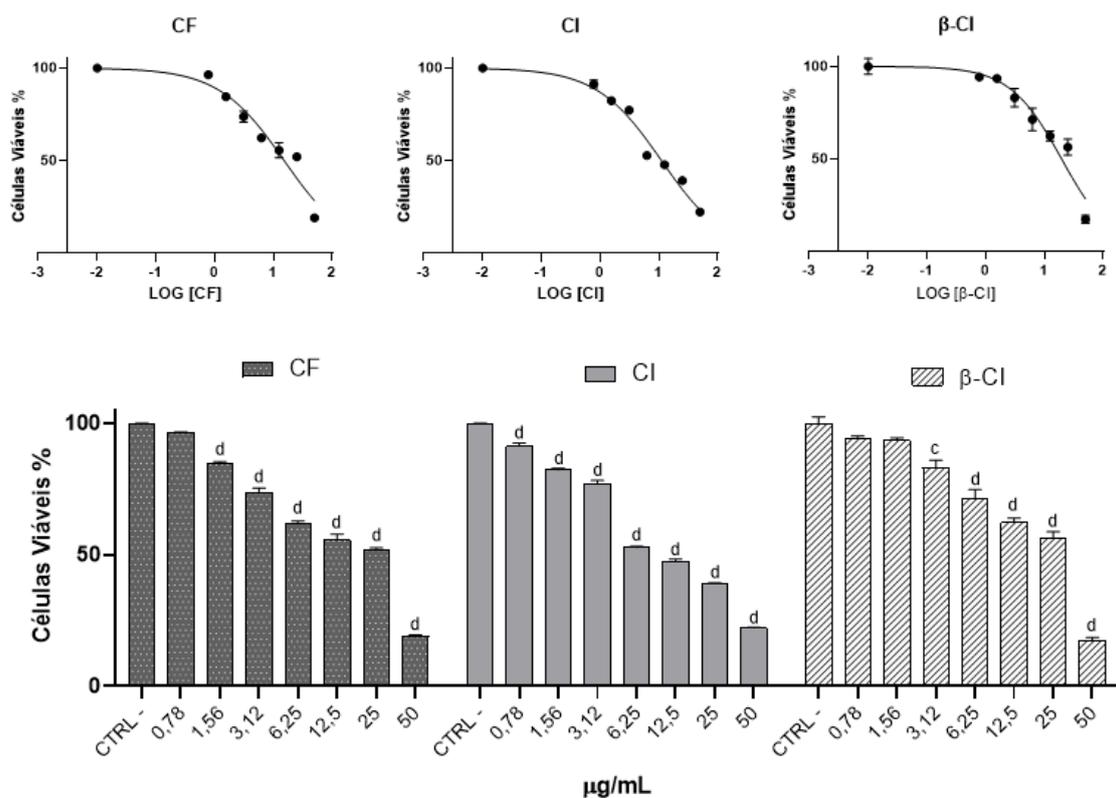


**Figura 10:** Ensaio de viabilidade celular de MTT em células HeLa (Doxorrubicina). Curvas dose-resposta e gráfico de viabilidade celular. Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias e pós teste de Dunnet e são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. DMEM 10% SFB foi utilizado como controle negativo.

Também foi realizado ensaio de MTT dos compostos avaliados no presente trabalho, bem como da Doxorrubicina em células não-tumorais, para tanto foram utilizadas células de fibroblasto murino NIH-3t3. Assim como ocorrido em células HeLa, também nos fibroblastos NIH-3t3 os compostos testados mostraram certa citotoxicidade.

Após 24 horas de tratamento com o óleo essencial de *C. flexuosus*, Citral puro e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina foi possível observar que o óleo de *C. flexuosus* alterou a viabilidade celular das células NIH-3t3, já a partir de concentrações de 1,56  $\mu\text{g/mL}$ , porém a partir dos cálculos das curvas dose-resposta, foi possível observar que os valores de  $\text{IC}_{50}$  (15,2  $\mu\text{g/mL}$ ) foram ligeiramente superiores aos encontrados para as células HeLa. Comportamento semelhante foi observado para a amostra de Citral puro, concentrações a partir

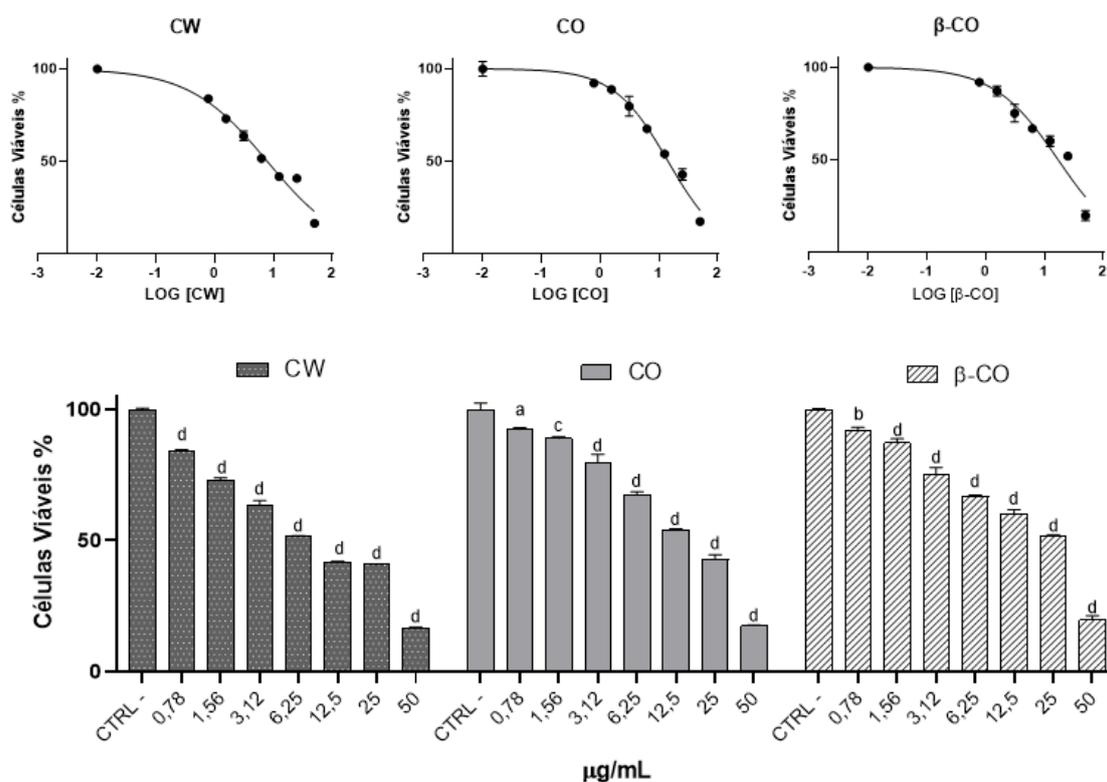
dos 0,78  $\mu\text{g/mL}$  foram capazes de induzir alterações significantes na viabilidade celular dos fibroblastos NIH-3t3, o valor de  $\text{IC}_{50}$  encontrado foi de 11  $\mu\text{g/mL}$ . Para a amostra de Citral complexado foi observada alteração na viabilidade celular em ensaio de MTT a partir da concentração de 3,12  $\mu\text{g/mL}$ , com valor de  $\text{IC}_{50}$  de 19,5  $\mu\text{g/mL}$ . As curvas dose-resposta e gráficos de viabilidade celular em fibroblastos NIH-3t3 estão ilustrados na figura 11.



**Figura 11:** Ensaio de viabilidade celular de MTT em células NIH-3t3 (*C. flexuosus*, Citral e Citral complexado). Curvas dose-resposta e gráfico de viabilidade celular. Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias e pós teste de Dunnet e são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. DMEM 10% SFB foi utilizado como controle negativo.

Ensaio de MTT utilizando o óleo de *C. winterianus*, Citronelal puro e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina foi realizado em células NIH-3t3. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que o óleo de *C. winterianus* apresentou citotoxicidade contra a linhagem NIH-3t3, alterando a viabilidade dos fibroblastos

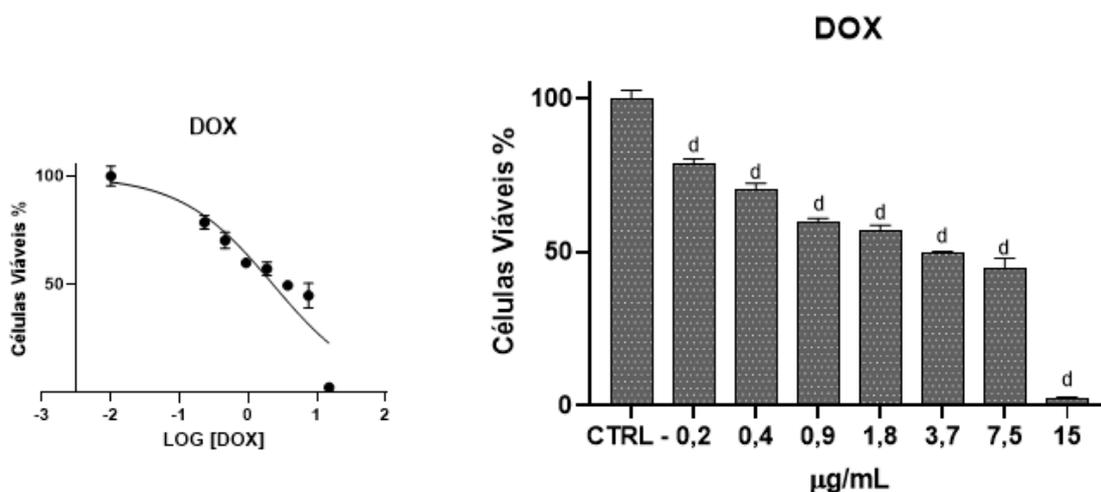
em concentrações a partir de 0,78  $\mu\text{g/mL}$  e apresentando valor de  $\text{IC}_{50}$  de 7,8  $\mu\text{g/mL}$ . O mesmo comportamento foi observado para as amostras de Citronelal puro e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina, para ambas as amostras concentrações de 0,78  $\mu\text{g/mL}$  foram capazes de alterar a viabilidade dos fibroblastos murinos. Foram obtidos valores de  $\text{IC}_{50}$  de 14,2  $\mu\text{g/mL}$  e 17  $\mu\text{g/mL}$  para o Citronelal puro e complexado, respectivamente (figura 12).



**Figura 12:** Ensaio de viabilidade celular de MTT em células NIH-3t3 (*C. winterianus*, Citronelal e Citronelal complexado). Curvas dose-resposta e gráfico de viabilidade celular. Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias e pós teste de Dunnet e são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. DMEM 10% SFB foi utilizado como controle negativo.

A doxorrubicina também foi testada em ensaio de MTT frente a linhagem NIH-3t3. Assim como nos óleos essenciais e compostos puros e complexados avaliados no presente trabalho, foi possível observar que a Doxorrubicina também apresentou citotoxicidade contra a linhagem NIH-3t3. A partir de concentração de 0,2  $\mu\text{g/mL}$  foi possível observar alteração na viabilidade celular

e o valor de IC<sub>50</sub> obtido a partir do cálculo da curva dose-resposta foi de 2,2 µg/mL (Figura 13).



**Figura 13:** Ensaio de viabilidade celular de MTT em células NIH-3t3 (Doxorrubicina). Curvas dose-resposta e gráfico de viabilidade celular. Os dados foram analisados com ANOVA de duas vias e pós teste de Dunnet e são apresentados em média ± erro padrão da média. DMEM 10% SFB foi utilizado como controle negativo.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE

A partir dos ensaios de MTT em células HeLa e NIH-3t3 foi possível obter os valores de IC<sub>50</sub> de cada uma das amostras avaliadas, com estes valores foi possível calcular o índice de seletividade das amostras, resultados superiores a 3 foram considerados seletivos. A partir dos cálculos foi possível observar que à exceção do Citral complexado com β-ciclodextrina (IS 2,6), as demais substâncias avaliadas apresentaram índice de seletividade superior a 3. Os óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C. winterianus* apresentaram IS de 5,2 e 3,1 respectivamente. As amostras de Citral e Citronelal puro e complexado com β-ciclodextrina apresentaram IS de 3,4, 3,3 e 3,7, sugerindo dessa forma uma boa

seletividade. Assim como a amostra de Citral-  $\beta$ -ciclodextrina, a doxorrubicina apresentou baixa seletividade, com IS de 1,6. Os resultados estão sumarizados na tabela 4.

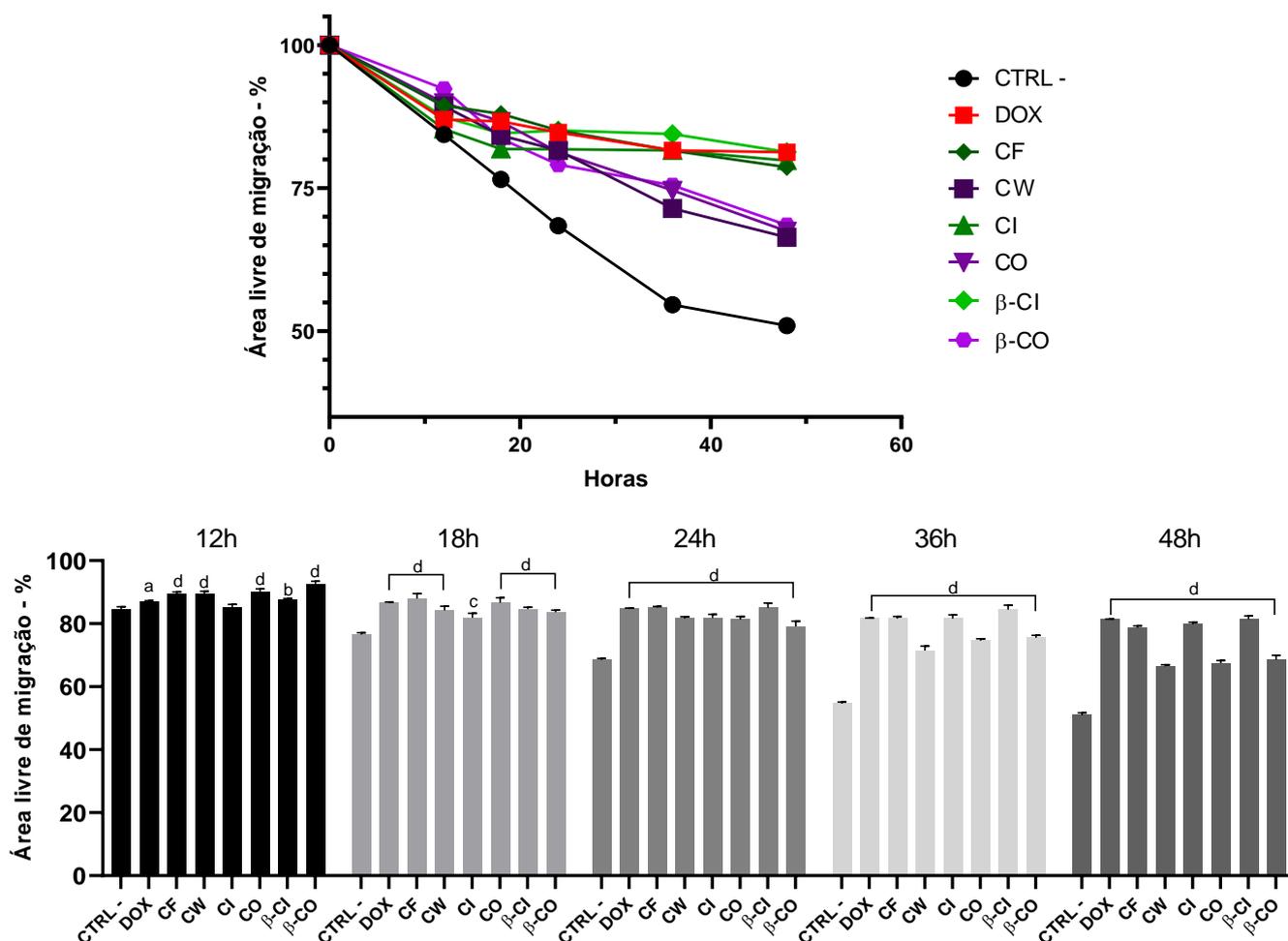
**Tabela 4:** Índice de Seletividade – Células HeLa e NIH-3t3

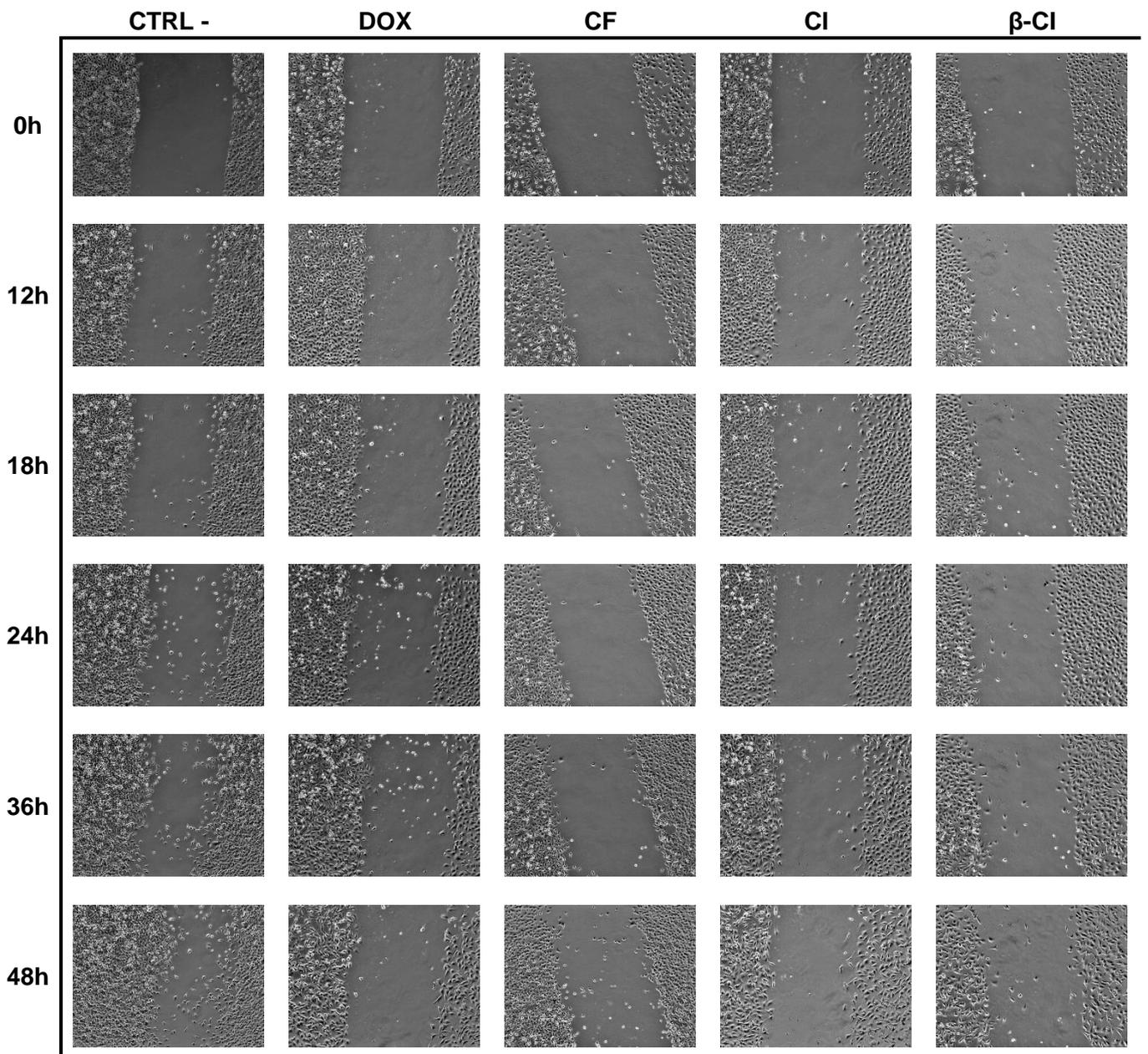
Amostra	Valores de IC <sub>50</sub>		Índice de seletividade
	NIH-3T3	HeLa	
<i>C. flexuosus</i>	15,2 $\mu$ g/mL	2,9 $\mu$ g/mL	5,2
<i>C. winterianus</i>	7,8 $\mu$ g/mL	2,5 $\mu$ g/mL	3,1
Citral	11 $\mu$ g/mL	3,2 $\mu$ g/mL	3,4
Citronelal	14,2 $\mu$ g/mL	4,2 $\mu$ g/mL	3,3
$\beta$ cd-Citral	19,5 $\mu$ g/mL	7,4 $\mu$ g/mL	2,6
$\beta$ cd-Citronelal	17 $\mu$ g/mL	4,5 $\mu$ g/mL	3,7
Doxorrubicina	2,2 $\mu$ g/mL	1,3 $\mu$ g/mL	1,6

#### 4.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR – WOUND HEALING

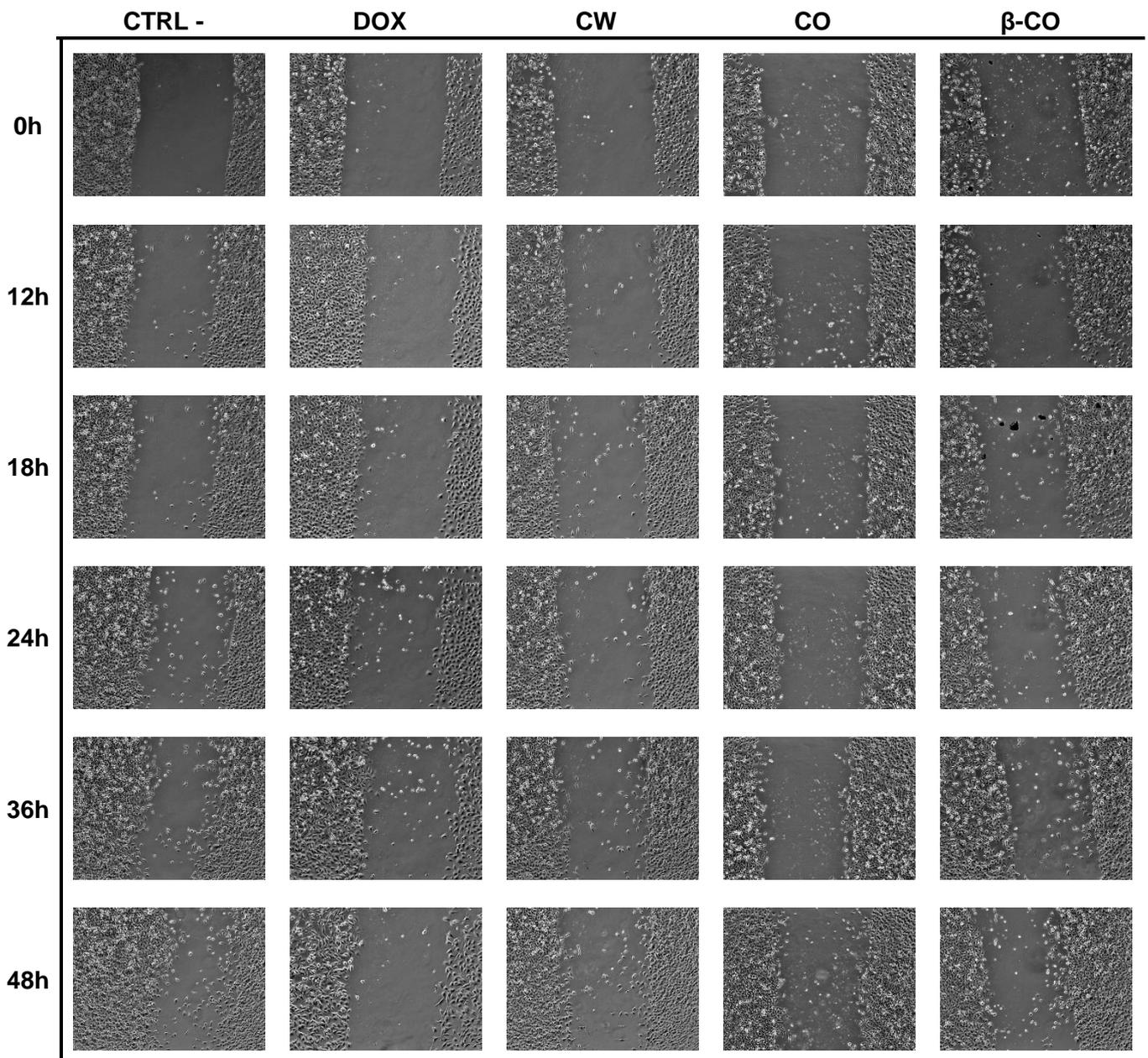
Um dos importantes processos da metástase do câncer é a migração celular. Os efeitos dos óleos essenciais de *C. flexuosus*, *C. winterianus*, do Citral e Citronelal puros e complexados com  $\beta$ -ciclodextrina na migração celular foram avaliados por ensaio *in vitro* de migração *wound healing*. No grupo controle, as células HeLa migraram para fechar 49,02% as áreas do risco após 48 horas. Entretanto, nos grupos de tratamento, os óleos essenciais de *C. flexuosus*, *C. winterianus*, o Citral e o Citronelal puros e complexados com  $\beta$ -ciclodextrina

reduziram significativamente a migração celular para as áreas do risco já a partir das 18 horas (figuras 14, 15 e 16).





**Figura 15:** Fotomicrografias representativas do ensaio wound healing de células HeLa. Controle negativo, Doxorrubicina, *C. flexuosus*, Citral e Citral  $\beta$ -ciclodextrina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido EVOS XL Core, no aumento de 10x, imediatamente após a realização do risco e após 12, 18, 24, 36 e 48 horas. As fotografias foram analisadas no software ImageJ versão 1.54 d, utilizando o plugin Wound\_healing\_size\_tool.



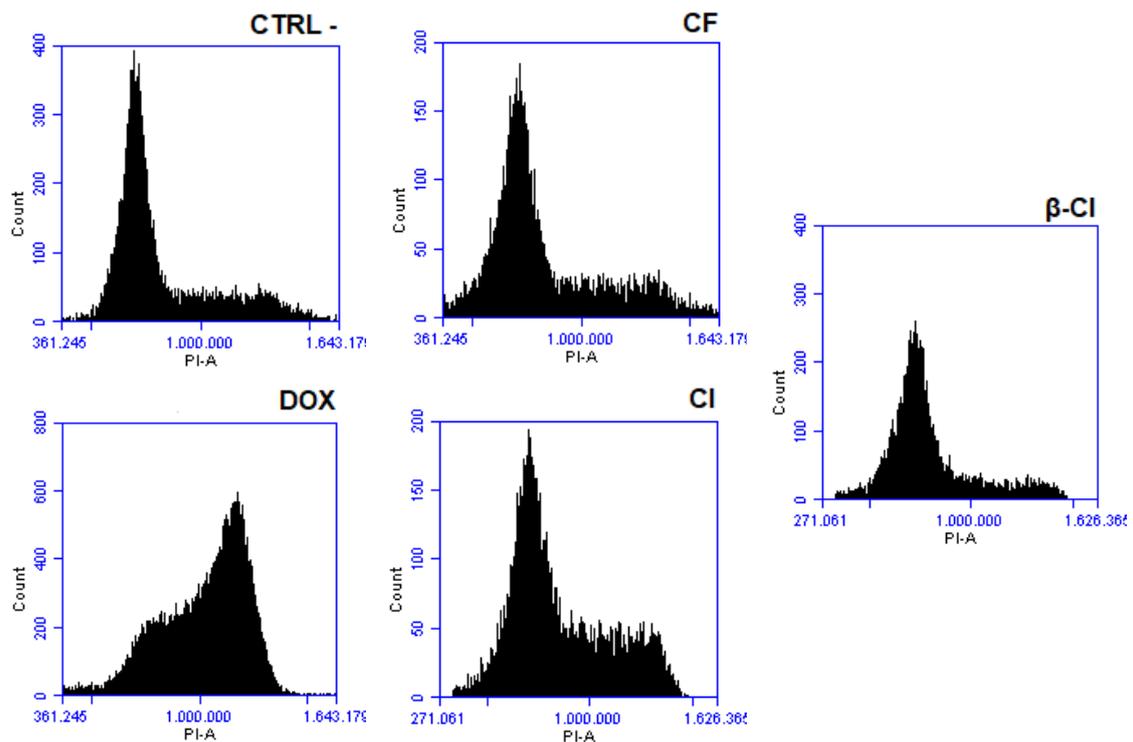
**Figura 16:** Fotomicrografias representativas do ensaio wound healing de células HeLa, série CW. Controle negativo, Doxorrubicina, *C. winterianus*, Citronelal e Citronelal  $\beta$ -ciclodextrina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido EVOS XL Core, no aumento de 10x, imediatamente após a realização do risco e após 12, 18, 24, 36 e 48 horas. As fotografias foram analisadas no software ImageJ versão 1.54 d, utilizando o plugin Wound\_healing\_size\_tool.

## 4.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

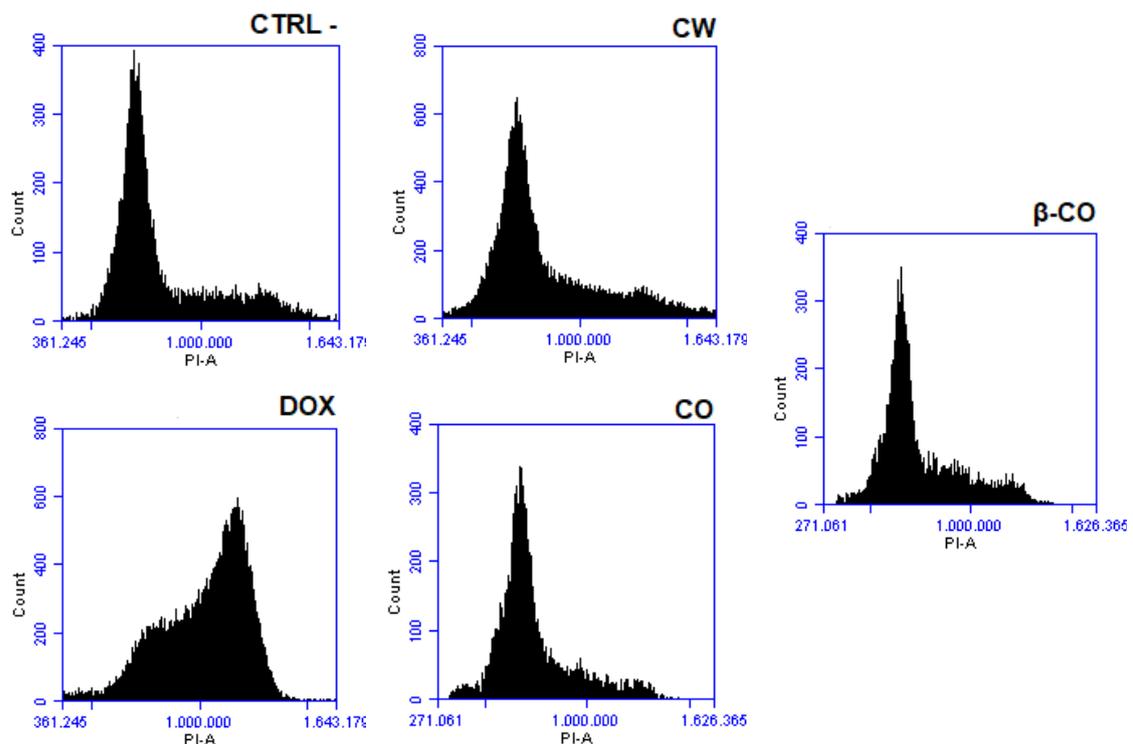
A parada do ciclo celular é um mecanismo que as células usam para prevenir a progressão do ciclo celular quando encontram danos irreparáveis ao DNA durante a replicação, estes danos podem levar a célula a um estado de senescência ou a apoptose. No grupo controle ocorreu um acúmulo de células em G0/G1 (80%), nos grupos de tratamento, todas as amostras testadas produziram significativo acúmulo de células na fase G2/M, com destaque para a amostra de Citral puro 17,5%, contra apenas 4,6% no grupo controle. Outro significativo acúmulo de células foi observado na fase S, para as amostras de Citral puro, Citral e Citronelal complexados com  $\beta$ -ciclodextrina com 23,7%, 15,4% e 16,2%, respectivamente, contra 9,5% do grupo controle (Tabela 5, figuras 15, 16 e 17).

**Tabela 5:** Média % de eventos por fase do ciclo celular em células HeLa

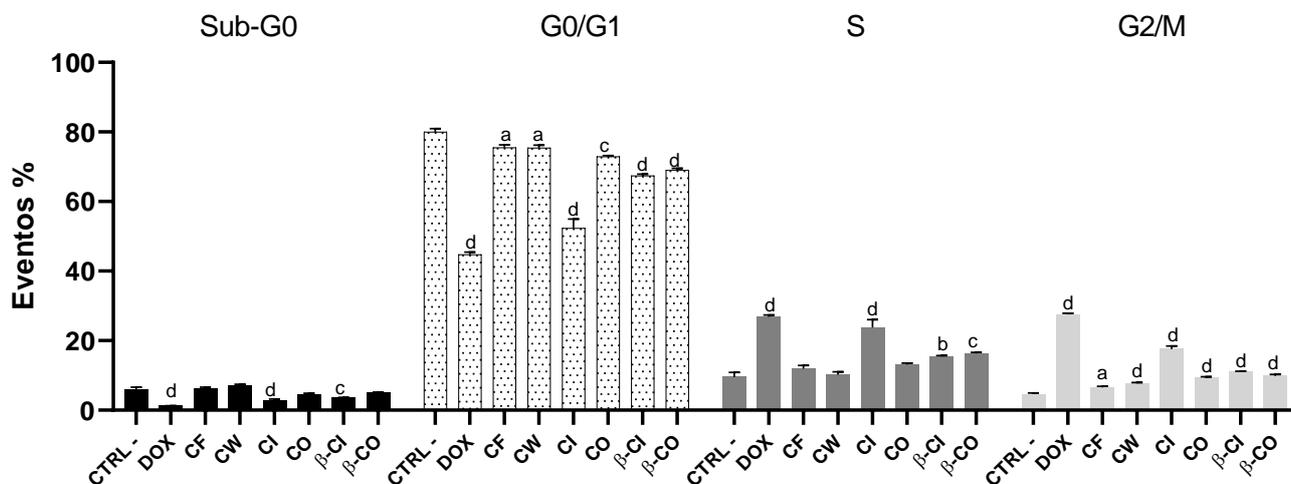
	<b>Sub-G0</b>	<b>G0/G1</b>	<b>S</b>	<b>G2/M</b>
<b>CTRL -</b>	5,9	80	9,5	4,6
<b>DOX</b>	1,2	44,8	26,8	27,5
<b>CF</b>	6,1	75,5	11,9	6,5
<b>CW</b>	6,9	75,4	10,1	7,6
<b>CI</b>	2,7	52,3	23,7	17,5
<b>CO</b>	4,5	72,9	13,1	9,2
<b><math>\beta</math>-CI</b>	3,6	67,4	15,4	11
<b><math>\beta</math>-CO</b>	4,9	69	16,2	9,9



**Figura 17:** Histogramas representativos da análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células HeLa, série CF. CTRL - (Controle Negativo), DOX (Doxorrubicina), CF (*C. flexuosus*), CI (Citral) e  $\beta$ -CI (Citral complexado com  $\beta$ -ciclodextrina)



**Figura 18:** Histogramas representativos da análise do ciclo celular por citometria de fluxo em células HeLa série CW. CTRL - (Controle Negativo), DOX (Doxorrubicina), CW (*C. winterianus*), CO (Citronelal) e  $\beta$ -CO (Citronelal complexado com  $\beta$ -ciclodextrina)



**Figura 19:** Avaliação do ciclo celular. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  SEM. One-way ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett foi utilizado para analisar a diferença entre os grupos controle e tratamentos, valor de  $p < 0,05$  considerado significativo (a  $p < 0,05$ , b  $p < 0,005$ , c  $p < 0,0005$ , d  $p < 0,0001$ ).

## 5. DISCUSSÃO

O câncer de colo do útero é um problema complexo globalmente, de acordo com dados do *Global Cancer Observatory* é o quarto tipo de câncer mais comum na população feminina e o terceiro em mortalidade. Dados disponíveis em 2024 dão conta de um número de 662.301 novos casos e cerca de 348.874 mortes notificadas, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2024). No contexto nacional os números são igualmente preocupantes, ainda segundo números disponíveis em 2024 no *Global Cancer Observatory*, foram diagnosticados 18.715 novos casos e 9.905 mortes, tornando este tipo de câncer o quarto de maior incidência e mortalidade entre mulheres no Brasil (WHO, 2024). Não obstante o advento de novas técnicas de diagnóstico e estratégias preventivas, como a vacinação contra o papilomavírus humano (HPV), os números referentes a incidência e mortalidade continuam alarmantes, especialmente em países de baixo

e médio desenvolvimento, onde a infraestrutura e os recursos destinados a saúde são escassos (BOSCH *et al.*, 2013). Além disso, a ocorrência de resistência a múltiplas drogas (MDR) torna ainda mais complicado o tratamento do câncer de colo do útero, a MDR é um fenômeno pelo qual as células cancerosas adquirem resistência a medicamentos antineoplásicos estrutural e mecanicamente não relacionados. Os mecanismos relacionados a MDR incluem a diminuição da apoptose, mecanismos melhorados de reparação de danos no DNA e/ou a alteração do metabolismo do medicamento (JI *et al.*, 2019), dessa forma o desenvolvimento de novas drogas eficientes e seguras torna-se necessário.

Nesse contexto os produtos naturais, historicamente, vêm desempenhando um papel central na descoberta de novos medicamentos para diferentes patologias, como para doenças infecciosas, doenças cardiovasculares, para a esclerose múltipla, bem como para o câncer (ATANASOV *et al.*, 2015; HARVEY *et al.*, 2015; NEWMAN e CRAGG, 2020; TINTORE *et al.*, 2019). A busca por novos medicamentos reavivou o interesse na descoberta de medicamentos fitoterápicos provenientes de diferentes recursos naturais, atualmente dentre os medicamentos utilizados no sistema de saúde moderno cerca de 50% deles possuem origem natural (BARKAT *et al.*, 2021).

A composição fitoquímica das plantas pode variar significativamente em função de diversos fatores, como clima, localidade, tipo de solo, altitude e até mesmo práticas de cultivo. Essas diferenças podem influenciar tanto a qualidade quanto a quantidade de compostos bioativos presentes nas plantas, que são importantes para suas propriedades nutricionais e medicinais (BURNEO *et al.*, 2021). No presente trabalho a composição química dos óleos essenciais de *C.*

*flexuosus* e *C. winterianus* foi avaliada por GC/MS. Na amostra de *C. flexuosus* foram identificadas 27 diferentes substâncias, compreendendo 99,57% do total da amostra analisada. O óleo essencial é composto principalmente pelo Citral (70,19%), na soma dos isômeros  $\alpha$ -Citral (43,67%) e  $\beta$ -Citral (26,52%), seguido pelo Acetato de Geranila (9,53%), Óxido de Cariofileno (4,67%), Geraniol (3,83%) e pelo Linalol (2,99%), resultado semelhante ao encontrado por Scotti e colaboradores (SCOTTI *et al.*, 2024). No óleo essencial de *C. winterianus* foram identificadas 37 diferentes substâncias, compreendendo 98,86% do total da amostra. As mais abundantes substâncias encontradas na amostra foram o Citronelal (38,89%), seguido pelo Citronelol (20,36%) e pelo Geraniol (11,89%), em trabalho conduzido por Rammal e colegas, foram identificadas 50 diferentes substâncias no óleo essencial de *C. winterianus* de plantas cultivadas no Líbano, os compostos mais abundantes nessa amostra permanecem os mesmos, Citronelal, Citronelol e Geraniol, a proporção entre eles, porém, difere sendo 32,61% para o Citronelal, 17,54% Citronelol e 25,94% Geraniol (RAMMAL *et al.*, 2024), evidenciando assim que a composição química do óleo essencial pode variar, segundo diferenças de cultivo.

O Citral e o Citronelal são moléculas pequenas e voláteis com solubilidade limitada em água, que podem ser degradadas sob condições ambientais como luz e calor. A complexação com  $\beta$ -ciclodextrina foi conduzida para proteger o Citral e Citronelal da oxidação para melhorar sua biodisponibilidade, com objetivo de melhorar seu potencial de ação (LIS *et al.*, 2018, MOHANDOSS *et al.*, 2019). Assim, a complexação foi caracterizada por DSC e TG para detectar alterações na temperatura de fusão, avaliar a estabilidade térmica, determinar as proporções relativas dos componentes e avaliar a estabilidade do complexo. Estas análises são

cruciais para a compreensão da formação e comportamento de complexos sob diferentes condições. Além disso, os picos de DSC diminuem ou desaparecem devido à complexação. As curvas TG/DTG indicam a estabilidade térmica das amostras por alterações ou perdas em sua massa em função da temperatura.

A curva DSC para  $\beta$ -ciclodextrina mostrou dois eventos endotérmicos, primeiro em aproximadamente 96°C, que está associado à perda de água dentro da cavidade da molécula. Forma semelhante foi observada em estudo anterior (DE ALMEIDA MAGALHÃES *et al.*, 2020) onde foi obtido um pico de 75°C para a  $\beta$ -ciclodextrina. O segundo evento endotérmico seguido de um exotérmico foi observado a 316°C. Esses eventos estão relacionados à fusão seguida pela degradação da  $\beta$ -ciclodextrina. Resultado semelhante foi observado em outro estudo, que obteve esse comportamento na faixa de 285-344°C (ANDRADE *et al.*, 2017). Assim, analisando os termogramas do composto coevaporado e da mistura física, pode-se determinar que o processo de complexação utilizando o método coevaporado apresentou uma complexação superior quando comparado ao método físico, que apresenta um pico endotérmico de baixa intensidade na região do evento de volatilização. Condução semelhante foi observada na literatura no óleo essencial de *Cymbopogon Winterianus*, no DSC foi possível observar um pico endotérmico próximo a 146°C no composto puro que foi associado à volatilização das moléculas do óleo (SANTOS *et al.*, 2016).

As curvas TG/DTG do citronelal mostraram uma perda de massa significativa durante o primeiro evento ( $\Delta m$  92,3%), que começou em 54,14°C e terminou em aproximadamente 171°C. Este evento está associado à volatilização do óleo, resultado semelhante foi observado na literatura em que obtiveram um único evento

nesta temperatura com perda de massa de 99,11% (SANTOS *et al.*, 2016). O termograma da  $\beta$ -ciclodextrina revela dois eventos de perda de massa. O primeiro evento ocorreu entre 63°C e 118°C ( $\Delta m$  14%) e está associado à desidratação da  $\beta$ -ciclodextrina (Payamifar e Poursattar Marjani, 2023). Outro evento observado ocorreu entre 310°C e aproximadamente 359°C ( $\Delta m$  85,64%), e está relacionado à decomposição da  $\beta$ -ciclodextrina (Lin *et al.*, 2021). A análise dos termogramas para a MP e CoE revela a presença de dois eventos térmicos, semelhantes aos observados na  $\beta$ -ciclodextrina. Para CoE, o primeiro evento começou a 54°C, enquanto em na MP começou a 66,33°C, com ambos os eventos concluindo perto de 127°C ( $\Delta m$  17% para PM e 27% para CoE). Este evento térmico está provavelmente associado à desidratação da  $\beta$ -ciclodextrina presente nas amostras e à volatilização do óleo. Além disso, a ocorrência deste evento indica a formação de um complexo, sugerindo que as moléculas de água originalmente presentes na cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina foram substituídas por moléculas do Citronelal (SANTOS *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2017). Outro evento observado para a MF e CoE começou em temperaturas de 308,39°C para CoE e 307°C para MF, e terminou em aproximadamente 358,32°C para CoE e 350°C para MF, com valores de  $\Delta m$  de 90,5% e 86%, respectivamente.

A viabilidade celular após o tratamento com os óleos essenciais de *C. flexuosus*, *C. winterianus*, Citral e Citronelal puros e complexados com  $\beta$ -ciclodextrina foi avaliada em células de câncer cervical HeLa e fibroblastos não-tumorais NIH-3t3. As amostras avaliadas mostraram-se citotóxicas contra a linhagem celular HeLa, com valores de IC50 variando de 2,57 a 7,42  $\mu\text{g/mL}$ . Os óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C. winterianus* mostraram significativa atividade citotóxica frente a linhagem celular HeLa, com IC50 de 2,90 e 2,57  $\mu\text{g/mL}$ ,

respectivamente, resta demonstrado na literatura efeito semelhante, onde o óleo essencial de *C. flexuosus* obteve valor de IC<sub>50</sub> de 6,5 µg/mL contra a linhagem de câncer cervical SiHa (SHARMA *et al.*, 2009), Kumar e colaboradores (KUMAR *et al.*, 2008) sugerem que o tratamento com óleo essencial de *C. flexuosus* ativa as vias intrínseca e extrínseca de apoptose, posteriormente ativando a caspase 3 efetora, culminando com a apoptose. As amostras de Citral puro e complexado com β-ciclodextrina também se mostraram efetivas contra a linhagem HeLa com valores de IC<sub>50</sub> de 3,26 e 7,42 µg/mL respectivamente, diferentes mecanismos de ação vêm sendo propostos para os efeitos do Citral no câncer. O Citral induz estresse oxidativo com aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), implicadas na promoção de apoptose e ativação do supressor tumoral p53, com regulação positiva de diferentes fatores de sinalização como Bax, PUMA e NOXA. O estresse oxidativo também ativa as vias de sinalização ERK1/2-AKTPI3K-NFκB levando à morte celular. O Citral também inibe a enzima ALDH1A3 envolvida na conversão de retinal em ácido retinóico gerando danos ao DNA (BAILLY, 2020). Foram obtidos valores de IC<sub>50</sub> de 4,19 e 4,21 µg/mL, respectivamente, para amostras de Citronelal puro e complexado com β-ciclodextrina contra células HeLa, o Citronelal mostrou efeitos anticancer ao induzir apoptose através da inibição da proteína antiapoptótica Bcl-2, levando à ativação da proteína Bax pró-apoptótica e induzindo a via de apoptose dependente de caspase, ativando a proteína caspase-3 (HO *et al.*, 2020). A avaliação do índice de seletividade na pesquisa de fitoterápicos é essencial para a determinar a continuidade ou não de novos trabalhos (INDRAYANTO *et al.*, 2020). As amostras testadas no presente trabalho demonstraram bons índices de seletividade, quando confrontados os valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios de MTT com a linhagem tumoral HeLa e os fibroblastos não tumorais NIH-3t3, a amostra de

Citral complexado com  $\beta$ -ciclodextrina e a Doxorubicina obtiveram valores de seletividade inferiores a 3, demonstrando um índice de seletividade baixo.

A metástase de células tumorais é a principal causa de morte relacionada ao câncer e já foi descrita como um processo específico no qual uma grande quantidade de células tumorais deixa seu sítio primário, circula no sangue periférico, passa pelos vasos sanguíneos e finalmente se instala em um órgão distante (GERSTBERGER *et al.*, 2023). No presente trabalho o ensaio de migração celular *Wound Healing*, foi empregado com o objetivo de avaliar os efeitos das substâncias testadas sobre a migração, *in vitro*, de células de câncer cervical HeLa. Os resultados demonstraram que as amostras testadas reduziram a área de migração das células, Ho e colaboradores demonstraram efeito semelhante quando avaliaram os efeitos do Citronelal sobre a migração de células MDA-MB-231, também utilizando ensaio de migração *Wound Healing* (HO *et al.*, 2020). Os efeitos do óleo essencial de *C. flexuosus*, do Citral puro e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina foram mais pronunciados na inibição da migração de células HeLa. Após 48 horas de tratamento o controle negativo demonstrou apenas 50,98% de área livre de migração, enquanto *C. flexuosus*, Citral puro e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina demonstraram 78,67%, 79,82% e 81,84%, respectivamente. Em estudo de Nordin e colegas (NORDIN *et al.*, 2019), foram demonstrados os efeitos do Citral para a inibição da migração, em ensaio *Wound healing* e ensaio de invasão *Transwell*, em células MDA-MB-231.

A análise de ciclo celular foi avaliada, em ordem a auxiliar no entendimento sobre a forma de atuação das substâncias estudadas no presente trabalho. Os resultados demonstraram que ocorreu uma diminuição do número percentual na

fase G0/G1 de células HeLa em todas as substâncias avaliadas, quando comparadas ao controle negativo, com concomitante acúmulo de células na fase G2/M. Além destes, também pode ser observado acúmulo de células na fase S para as amostras de Doxorrubicina, Citral puro e Citronelal e Citral complexados com  $\beta$ -ciclodextrina. A parada do ciclo celular na fase G2/M promovida pelo Citral já foi demonstrada sobre células MDA-MB-231 (NORDIN *et al.*, 2019), efeito semelhante sobre o ciclo celular também foi observado com o tratamento utilizando o Citronelal em células de câncer de mama, após 24 horas de tratamento foi observado acúmulo de células na fase G2/M (HO *et al.*, 2020).

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que os óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C. winterianus*, o Citral e Citronelal puros e complexados com  $\beta$ -ciclodextrina demonstraram promissoras atividades anticâncer em linhagem de câncer cervical HeLa. As amostras possuem atividade citotóxica, observado em ensaio de MTT e demonstraram boa seletividade, à exceção do Citral complexado com  $\beta$ -ciclodextrina. A taxa de migração de células HeLa foi diminuída após os tratamentos com todas as substâncias testadas, em ensaio *in vitro* *Wound Healing*. Além disso, foi possível observar diminuição de células na fase G0/G1 do ciclo celular, com concomitante acúmulo de células em G2/M. Em conjunto, os efeitos observados no presente trabalho sugerem que as substâncias estudadas possuem promissor potencial como agentes anticâncer.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad A, Viljoen A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine*. 2015 Jun 1;22(6):657-65. doi: 10.1016/j.phymed.2015.04.002. Epub 2015 Apr 29. PMID: 26055131.

Almeida Lde F, Paula JF, Almeida RV, Williams DW, Hebling J, Cavalcanti YW. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontol Scand*. 2016 Jul;74(5):393-8. doi: 10.3109/00016357.2016.1166261. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27098375.

Andrade TA, Freitas TS, Araújo FO, et al. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* Benth essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin. *Biomed Pharmacother*. 2017;89:201-207. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.158

Angiolella L. Synergistic activity of *Pelargonium capitatum* and *Cymbopogon martini* essential oils against *C. albicans*. *Nat Prod Res*. 2020 Aug 25:1-5. doi: 10.1080/14786419.2020.1810037. Epub ahead of print. PMID: 32840389.

Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv*. 2015;33(8):1582-1614. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.08.001

Avoseh O, Oyedeji O, Rungqu P, Nkeh-Chungag B, Oyedeji A. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance.

Molecules. 2015 Apr 23;20(5):7438-53. doi: 10.3390/molecules20057438. PMID: 25915460; PMCID: PMC6272507.

Bailly C. Targets and pathways involved in the antitumor activity of citral and its stereo-isomers. Eur J Pharmacol. 2020;871:172945. doi:10.1016/j.ejphar.2020.172945

Barkat MA, Goyal A, Barkat HA, Salauddin M, Pottou FH, Anwer ET. Herbal Medicine: Clinical Perspective and Regulatory Status. Comb Chem High Throughput Screen. 2021;24(10):1573-1582. doi:10.2174/1386207323999201110192942

Bayala B, Coulibaly LL, Djigma F, et al. Chemical Composition of Essential Oil of *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng from Burkina Faso, and Effects against Prostate and Cervical Cancer Cell Lines. Molecules. 2023;28(11):4561. Published 2023 Jun 5. doi:10.3390/molecules28114561

Bosch FX, Broker TR, Forman D, et al. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. Vaccine. 2013;31 Suppl 7(Suppl 7):H1-H31. doi:10.1016/j.vaccine.2013.10.003

Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Adv Drug Deliv Rev. 2007 Jul 30;59(7):645-66. doi: 10.1016/j.addr.2007.05.012. Epub 2007 May 29. PMID: 17601630.

Burneo JI, Benítez Á, Calva J, Velastegui P, Morocho V. Soil and Leaf Nutrients Drivers on the Chemical Composition of the Essential Oil of *Siparuna muricata* (Ruiz & Pav.) A. DC. from Ecuador. Molecules. 2021;26(10):2949. Published 2021 May 15. doi:10.3390/molecules26102949

Campos CA, Lima BS, Trindade GGG, Souza EPBSS, Mota DSA, Heimfarth L, Quintans JSS, Quintans-Júnior LJ, Sussuchi EM, Sarmiento VHV, Carvalho FMS, Marreto RN, Costa RMR, Nunes RS, Araújo AAS, Shanmugam S, Thangaraj P. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. *Life Sci.* 2019 Jul 15;229:139-148. doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.026. Epub 2019 May 11. PMID: 31085246.

Chen Z, Ling K, Zhu Y, Deng L, Li Y, Liang Z. Rucaparib antagonize multidrug resistance in cervical cancer cells through blocking the function of ABC transporters. *Gene.* 2020 Oct 30;759:145000. doi: 10.1016/j.gene.2020.145000. Epub 2020 Jul 25. PMID: 32717310.

Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* 2006 Apr 14;8(2):E239-53. doi: 10.1007/BF02854894. PMID: 16796374; PMCID: PMC3231566.

Choudhari AS, Mandave PC, Deshpande M, Ranjekar P, Prakash O. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice [published correction appears in *Front Pharmacol.* 2020 Feb 28;11:175. doi: 10.3389/fphar.2020.00175]. *Front Pharmacol.* 2020;10:1614. Published 2020 Jan 28. doi:10.3389/fphar.2019.01614

Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2013 Sep 7;382(9895):889-99. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60022-7. Epub 2013 Apr 23. PMID: 23618600.

Cuenca-León K, Lima-Illescas M, Pacheco-Quito EM, Vélez-León E, Zarzuelo-Castañeda A. Effectiveness of Lemon Verbena (*Cymbopogon citratus*) in Oral Candidiasis: A Systematic Review. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2024;16:295-305. Published 2024 Sep 10. doi:10.2147/CCIDE.S478181

de Almeida Magalhães TSS, de Oliveira Macedo PC, Kawashima Pacheco SY, et al. Development and Evaluation of Antimicrobial and Modulatory Activity of Inclusion Complex of Euterpe oleracea Mart Oil and  $\beta$ -Cyclodextrin or HP- $\beta$ -Cyclodextrin. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):942. Published 2020 Jan 31. doi:10.3390/ijms21030942

Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, Creatsas G. HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2013;2013:540850. doi: 10.1155/2013/540850. Epub 2013 Aug 20. PMID: 24023507; PMCID: PMC3762170.

Dewick, PM. *Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach*, 3rd ed., Wiley: United Kingdom, 2009.

El-Helaly AA, El-Masarawy MS, El-Bendary HM. Using Citronella to Protect Bees (honeybee *Apis mellifera* L.) from certain Insecticides and Their Nano Formulations. *Braz J Biol*. 2020 Oct 12:S1519-69842020005032208. doi: 10.1590/1519-6984.230140. Epub ahead of print. PMID: 33053125.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 12 nov. 2020

Gaonkar R, Shiralgi Y, Lakkappa DB, Hegde G. Essential oil from *Cymbopogon flexuosus* as the potential inhibitor for HSP90. *Toxicol Rep.* 2018 Apr 5;5:489-496. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.03.014. PMID: 29854620; PMCID: PMC5978008.

Gerstberger S, Jiang Q, Ganesh K. Metastasis. *Cell.* 2023;186(8):1564-1579. doi:10.1016/j.cell.2023.03.003

Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes.* 2010 Feb;40(1):1-13. doi: 10.1007/s11262-009-0412-8. Epub 2009 Oct 17. PMID: 19838783.

Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(2):111-129. doi:10.1038/nrd4510

Ho Y, Suphrom N, Daowtak K, Potup P, Thongsri Y, Usuwanthim K. Anticancer Effect of *Citrus hystrix* DC. Leaf Extract and Its Bioactive Constituents Citronellol and, Citronellal on the Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Line. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020 Dec 18;13(12):476. doi: 10.3390/ph13120476. PMID: 33353129; PMCID: PMC7766836.

Huber, PC, Maruiama, CH, Almeida, WP. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Química Nova.* 2010 33(10), 2148-2154. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000027>

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/>. Acesso: 10/11/2020

Indrayanto G, Putra GS, Suhud F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2021;46:273-307. doi: 10.1016/bs.podrm.2020.07.005. Epub 2020 Aug 27. PMID: 33461699.

Ji N, Yang Y, Cai CY, et al. Selonsertib (GS-4997), an ASK1 inhibitor, antagonizes multidrug resistance in ABCB1- and ABCG2-overexpressing cancer cells. *Cancer Lett.* 2019;440-441:82-93. doi:10.1016/j.canlet.2018.10.007

Kiełtyka-Dadasiewicz A, Esteban J, Jabłońska-Trypuć A. Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Anticancer Activity of Plant Materials Derived from *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Species. *Pharmaceuticals (Basel).* 2024;17(6):705. Published 2024 May 29. doi:10.3390/ph17060705

Kinghorn AD, Pan L, Fletcher JN, Chai H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J Nat Prod.* 2011 Jun 24;74(6):1539-55. doi: 10.1021/np200391c. Epub 2011 Jun 8. PMID: 21650152; PMCID: PMC3158731.

Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Mar;4(3):206-20. doi: 10.1038/nrd1657. PMID: 15729362.

Kumar A, Malik F, Bhushan S, et al. An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chem Biol Interact.* 2008;171(3):332-347. doi:10.1016/j.cbi.2007.10.003

Li W, Zhang H, Assaraf YG, Zhao K, Xu X, Xie J, Yang DH, Chen ZS. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel

therapeutic drug strategies. *Drug Resist Updat.* 2016 Jul;27:14-29. doi: 10.1016/j.drug.2016.05.001. Epub 2016 May 13. PMID: 27449595.

Lis MJ, García Carmona Ó, García Carmona C, Maestá Bezerra F. Inclusion Complexes of Citronella Oil with  $\beta$ -Cyclodextrin for Controlled Release in Biofunctional Textiles. *Polymers (Basel)*. 2018;10(12):1324. Published 2018 Nov 29. doi:10.3390/polym10121324

Lu WC, Huang DW, Wang CR, Yeh CH, Tsai JC, Huang YT, Li PH. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *J Food Drug Anal.* 2018 Jan;26(1):82-89. doi: 10.1016/j.jfda.2016.12.018. Epub 2017 Feb 14. PMID: 29389592.

Malik MNH, Abid I, Ismail S, et al. Exploring the hepatoprotective properties of citronellol: In vitro and in silico studies on ethanol-induced damage in HepG2 cells. *Open Life Sci.* 2024;19(1):20220950. Published 2024 Sep 9. doi:10.1515/biol-2022-0950

Manh HD, Hue DT, Hieu NTT, Tuyen DTT, Tuyet OT. The Mosquito Larvicidal Activity of Essential Oils from *Cymbopogon* and *Eucalyptus* Species in Vietnam. *Insects.* 2020 Feb 17;11(2):128. doi: 10.3390/insects11020128. PMID: 32079158; PMCID: PMC7073693.

McBride AA. Oncogenic human papillomaviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017 Oct 19;372(1732):20160273. doi: 10.1098/rstb.2016.0273. PMID: 28893940; PMCID: PMC5597740.

Mohandoss S, Atchudan R, Immanuel Edison TNJ, et al. Enhanced solubility of guanosine by inclusion complexes with cyclodextrin derivatives: Preparation,

characterization, and evaluation. *Carbohydr Polym.* 2019;224:115166. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115166

Mukhtar MH, El-Readi MZ, Elzubier ME, et al. Cymbopogon citratus and Citral Overcome Doxorubicin Resistance in Cancer Cells via Modulating the Drug's Metabolism, Toxicity, and Multidrug Transporters. *Molecules.* 2023;28(8):3415. Published 2023 Apr 12. doi:10.3390/molecules28083415

Murahari M, Prakash KV, Peters GJ, Mayur YC. Acridone-pyrimidine hybrids- design, synthesis, cytotoxicity studies in resistant and sensitive cancer cells and molecular docking studies. *Eur J Med Chem.* 2017 Oct 20;139:961-981. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.08.023. Epub 2017 Aug 12. PMID: 28886509.

Nardoni S, Najar B, Fronte B, Pistelli L, Mancianti F. In Vitro Activity of Essential Oils against *Saprolegnia parasitica*. *Molecules.* 2019 Apr 1;24(7):1270. doi: 10.3390/molecules24071270. PMID: 30939843; PMCID: PMC6479710.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020;83(3):770-803. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285

Nordin N, Yeap SK, Rahman HS, et al. In vitro cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):1614. Published 2019 Feb 7. doi:10.1038/s41598-018-38214-x

Peng L, Yin L, Dai Y, Peng Y, Xu Y, Hu H, Qiao J. Human papillomavirus infection and follow-up on positive results in 7222 female samples obtained from 2016 to 2019 in Hefei, China. *PeerJ.* 2020 Oct 20;8:e10179. doi: 10.7717/peerj.10179. PMID: 33150081; PMCID: PMC7583622.

Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurugan BK, Jacob JA, Karuppusamy I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sci.* 2018;200:26-30. doi:10.1016/j.lfs.2018.03.023

Qian J, Xia M, Liu W, Li L, Yang J, Mei Y, Meng Q, Xie Y. Glabridin resensitizes p-glycoprotein-overexpressing multidrug-resistant cancer cells to conventional chemotherapeutic agents. *Eur J Pharmacol.* 2019 Jun 5;852:231-243. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.04.002. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30959046.

Quintans-Júnior LJ, Souza TT, Leite BS, Lessa NM, Bonjardim LR, Santos MR, Alves PB, Blank AF, Antonioli AR. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine.* 2008 Aug;15(8):619-24. doi: 10.1016/j.phymed.2007.09.018. Epub 2007 Oct 31. PMID: 17976969.

Rammal M, Badran A, Haidar C, et al. *Cymbopogon winterianus* (Java Citronella Plant): A Multi-Faceted Approach for Food Preservation, Insecticidal Effects, and Bread Application. *Foods.* 2024;13(5):803. Published 2024 Mar 5. doi:10.3390/foods13050803

Rodrigues LB, Martins AOBPB, Ribeiro-Filho J, Cesário FRAS, E Castro FF, de Albuquerque TR, Fernandes MNM, da Silva BAF, Quintans Júnior LJ, Araújo AAS, Menezes PDP, Nunes PS, Matos IG, Coutinho HDM, Goncalves Wanderley A, de Menezes IRA. Anti-inflammatory activity of the essential oil obtained from *Ocimum basilicum* complexed with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) in mice. *Food Chem Toxicol.* 2017 Nov;109(Pt 2):836-846. doi: 10.1016/j.fct.2017.02.027. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28235614.

Santos PL, Brito RG, Oliveira MA, et al. Docking, characterization and investigation of  $\beta$ -cyclodextrin complexed with citronellal, a monoterpene present in the essential oil of *Cymbopogon* species, as an anti-hyperalgesic agent in chronic muscle pain model. *Phytomedicine*. 2016;23(9):948-957. doi:10.1016/j.phymed.2016.06.007

Scotti R, Casciaro B, Stringaro A, Maggi F, Colone M, Gabbianelli R. Fighting Microbial Infections from *Escherichia coli* O157:H7: The Combined Use of Three Essential Oils of the *Cymbopogon* Genus and a Derivative of Esculentin-1a Peptide. *Antibiotics* (Basel). 2024;13(1):86. Published 2024 Jan 16. doi:10.3390/antibiotics13010086

Sharma PR, Mondhe DM, Muthiah S, et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. *Chem Biol Interact*. 2009;179(2-3):160-168. doi:10.1016/j.cbi.2008.12.004

Singh G, Katoch M. Antimicrobial activities and mechanism of action of *Cymbopogon khasianus* (Munro ex Hackel) Bor essential oil. *BMC Complement Med Ther*. 2020 Nov 5;20(1):331. doi: 10.1186/s12906-020-03112-1. PMID: 33153473; PMCID: PMC7643435.

Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. 2010 May;117(2 Suppl):S5-10. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.01.024. PMID: 20304221.

Staudt A, Duarte PF, Amaral BPD, Peixoto Andrade BCO, Simas NK, Correa Ramos Leal I, Sangenito LS, Santos ALS, de Oliveira D, Junges A, Cansian RL, Paroul N. Biological properties of functional flavoring produced by enzymatic esterification of citronellol and geraniol present in *Cymbopogon winterianus*

essential oil. *Nat Prod Res.* 2020 Aug 25:1-7. doi: 10.1080/14786419.2020.1810032. Epub ahead of print. PMID: 32840398.

Tazi A, El Moujahed S, Jaouad N, et al. Exploring the Bioactive Potential of Moroccan Lemon Grass (*Cymbopogon citratus* L.): Investigations on Molecular Weight Distribution and Antioxidant and Antimicrobial Potentials. *Molecules.* 2024;29(17):3982. Published 2024 Aug 23. doi:10.3390/molecules29173982

Vu M, Yu J, Awolude OA, Chuang L. Cervical cancer worldwide. *Curr Probl Cancer.* 2018 Sep;42(5):457-465. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2018.06.003. Epub 2018 Jun 25. PMID: 30064936.

Wagner W, Kania KD, Blauz A, Ciszewski WM. The lactate receptor (HCAR1/GPR81) contributes to doxorubicin chemoresistance via ABCB1 transporter up-regulation in human cervical cancer HeLa cells. *J Physiol Pharmacol.* 2017 Aug;68(4):555-564. PMID: 29151072.

WHO – World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/>. Acesso: 10/09/2024

Xiao S, Cui P, Shi W, Zhang Y. Identification of essential oils with activity against stationary phase *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Med Ther.* 2020 Mar 24;20(1):99. doi: 10.1186/s12906-020-02898-4. PMID: 32209108; PMCID: PMC7092464.

Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica.* 2008 Jul;38(7-8):802-32. doi: 10.1080/00498250701867889. PMID: 18668431.

## 8. ANEXOS

Artigo publicado como parte dos resultados do trabalho:  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119513>



Industrial Crops and Products

Volume 222, Part 2, 15 December 2024, 119513



# A comprehensive assessment of the antiproliferative effects of *Cymbopogon winterianus* essential oil, citronellal, and citronellal complexed with $\beta$ -cyclodextrin on cervical cancer cell line (HeLa)

Thiago Sardou Charret <sup>a b</sup>, Mariana Toledo Martins Pereira <sup>a b</sup>, Tarcísio Martins Santos <sup>c</sup>, Raquel Carvalho Castiglione <sup>d</sup>, Rafael L. Simões <sup>e</sup>, Ricardo Luiz Dantas Machado <sup>a f</sup>, Alberto Wisniewski Jr <sup>c</sup>, Erika Santos Lisboa <sup>g</sup>, Victoria Louise Santana dos Santos <sup>g</sup>, Patrícia Severino <sup>g</sup>, Vinicius D'Avila Bitencourt Pascoal <sup>b</sup>, Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal <sup>b 1</sup>  