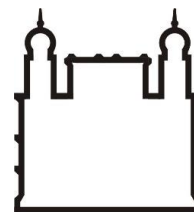




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DO RIZOMA DE *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) EM CÉLULAS DE
CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO**

MATEUS LIMA NOGUEIRA

Salvador – Bahia

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DO RIZOMA DE *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) EM CÉLULAS DE
CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO**

MATEUS LIMA NOGUEIRA

Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Coorientador: Dr. Daniel Pereira Bezerra

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

N778a Nogueira, Mateus Lima.
Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) em células de carcinoma hepatocelular humano. / Mateus Lima Nogueira. - 2020.
66 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório de Inovações em Terapias, Enisno e Bioprodutos (LITEB/IOC/FIOCRUZ).

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Carcinoma Hepatocelular., 2. *Cyperus articulatus*., 3. Óleo Essencial.
I. Título.

CDU 616.36-002


**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DO ÓLEO
ESSENCIAL DO RIZOMA DE *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) EM CÉLULAS DE
CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO”.**

Mateus Lima Nogueira

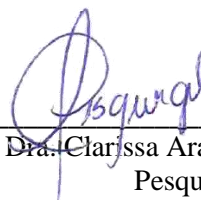
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 03 de março de 2020.

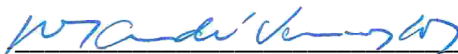
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Darizy Flávia Silva Amorim de
Vasconcelos
Professora
UFBA



Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Marcos André Vannier dos Santos
Pesquisador
FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

CNPq

FAPESB

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conferir a disposição, equilíbrio, lucidez e foco nos momentos em que mais precisei;

Aos meus pais e irmão por toda a compreensão, suporte e confiança, além dos anos de amor abnegado;

Ao meu orientador, Dr. Marcos Vannier, por mais uma vez acreditar que poderia avançar mais esta etapa. Obrigado por tantos ensinamentos, oportunidades ao longo desses anos e por sempre inculcar em seus alunos a responsabilidade social envolvida em fazer ciência;

Ao Dr. Daniel Bezerra, que gentilmente me acolheu em seu grupo de pesquisa e compartilhou pacientemente tanto conhecimento. Definitivamente posso dizer que fui agraciado com um segundo orientador neste trabalho;

À Sheila por continuar a ser a parceira mais importante na minha vida acadêmica, sendo muito solidária em dividir as tantas frustrações e as mais significativas alegrias deste percurso. Sou imensamente grato;

À Jéssica Mirella, que assim como eu passou por uma transição significativa durante a pós-graduação, e foi um rosto conhecido, receptivo e sempre amigável durante os últimos anos;

Ao grupo do câncer, do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, que, desde a recepção amistosa até as imensas contribuições para a concretização deste trabalho, se mostrou sempre unido e dedicado ao crescimento de cada membro. Quando pensei que não poderia encontrar um melhor ambiente para trabalhar, vocês me surpreenderam. Foi um privilégio;

Ao demais membros do LETI que da mesma forma foram muito receptivos e solícitos;

Aos Drs. Hector Koolen e Rosane Dias que desempenharam papéis fundamentais neste trabalho;

Aos membros da Plataforma de Citometria de Fluxo, e dos serviços de Biotério, Histotecnologia e Microscopia Eletrônica pela disponibilidade e ajuda;

À Biblioteca do IGM pela contribuição na revisão das normas desta dissertação;

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e à equipe da Coordenação de Ensino por todo o suporte;

Ao Instituto Gonçalo Moniz por oferecer a infraestrutura e serviços necessários para construção desta dissertação;

Ao CNPq, CAPES e a FAPESB por fornecerem os subsídios para este projeto.

*Sempre haverá um modo dentro de nós para
retomar o voo em direção ao sereno.*

Angelo Valsiglio.

NOGUEIRA, Mateus Lima. Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) em células de carcinoma hepatocelular humano. 66 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer é a designação dada a um grupo de doenças de origem multifatorial que representa um importante problema de saúde pública global. Neste grupo, o carcinoma hepatocelular se destaca como um dos mais letais, em consequência do seu desenvolvimento silencioso e tratamento dificultado. Tem-se dado, portanto, um importante destaque ao desenvolvimento de melhorias terapêuticas. Neste cenário, os óleos essenciais têm despertado o interesse científico devido à comprovada atividade citotóxica dos seus constituintes frente a neoplasias e *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) demonstrou, dentre seus vários efeitos farmacológicos, potencial atividade anticâncer. No entanto, não há registros sobre seus mecanismos de ação sobre nenhum tipo histológico neoplásico. **OBJETIVO:** Avaliar a atividade citotóxica *in vitro*, estudar os mecanismos de ação desempenhados e examinar a ação antitumoral *in vivo* do óleo essencial do rizoma de *C. articulatus* sobre células de carcinoma hepatocelular humano HepG2. **MÉTODOS:** O óleo essencial de *C. articulatus* foi obtido por hidrodestilação e sua composição avaliada qualitativa e quantitativamente por cromatografia gasosa. A atividade citotóxica foi mensurada frente a diferentes linhagens celulares cancerígenas (B16F10, HCT116, HepG2, HL-60 e MCF-7) e uma linhagem não cancerígena (MRC-5) pelo ensaio de alamar blue, em 72h. A seguir, células HepG2 foram avaliadas após tratamentos por 24, 48 e 72h empregando diferentes concentrações do óleo essencial (12,5, 25 e 50 µg/mL), para mensuração, pelo ensaio de exclusão por azul tripan, das células íntegras, seguido de uma avaliação morfológica. A avaliação do impacto do tratamento com o óleo-teste sobre a evolução do ciclo celular e determinação de células marcadas com anexina V-FITC/iodeto de propídio foram realizados por citometria de fluxo. A eficácia antitumoral e a toxicidade do tratamento foi avaliada em modelo de xenotransplante heterotópico em camundongos C.B-17 SCID, inoculados com células HepG2. **RESULTADOS:** O óleo essencial de *C. articulatus* apresentou composição predominantemente formada por sesquiterpenos, e muscatona, cicocolorenona, α -pineno, pogostol, α -copaeno e óxido de cariofileno como substâncias majoritárias. Foi encontrada atividade citotóxica potente em células HepG2 ($IC_{50} = 28,5 \mu\text{g/mL}$), com redução do número de células íntegras, após 48 e 72h de tratamento, e alterações morfológicas consistentes com apoptose. O óleo levou ao aumento significativo no número de células em fase G_2/M do ciclo celular, seguido de fragmentação internucleossomal do DNA. O tratamento resultou no aumento de células com marcação pela anexina V-FITC, sugerindo morte celular apoptótica. Em modelo *in vivo*, o óleo resultou em retração no desenvolvimento dos tumores, apresentando índices de até 50% de inibição, com poucos eventos de toxicidade. **CONCLUSÕES:** O óleo essencial do rizoma de *C. articulatus* se apresenta como um potencial candidato ao desenvolvimento de uma nova estratégia quimioterápica para o carcinoma hepatocelular, uma vez que induz atividade citotóxica na linhagem HepG2, mediada por parada do ciclo celular em G_2/M , fragmentação do conteúdo intranucleossomal de DNA e aumento da externalização da fosfatidilserina, além de inibir o desenvolvimento tumoral em modelo de xenotransplante.

Palavras-Chave: Carcinoma Hepatocelular, *Cyperus articulatus*, HepG2, Óleo Essencial.

NOGUEIRA, Mateus Lima. Evaluation of cytotoxic and antitumor potential of *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) rhizome essential oil in human hepatocellular carcinoma cells. 66 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cancer is the designation given to a multifactorial origin group of diseases that represents an important global public health problem. In this group, hepatocellular carcinoma stands out as one of the most lethal, as a result of its silent development and difficult treatment. Therefore, an important emphasis has been given to the development of therapeutic improvements. In this scenario, essential oils have aroused scientific interest due to the proven cytotoxic activity of their constituents against neoplasms and *Cyperus articulatus* L. (Cyperaceae) demonstrated, among its various pharmacological effects, potential anticancer activity. However, there are no records of its mechanisms of action on any neoplastic histological type. **OBJECTIVE:** To evaluate the *in vitro* cytotoxic activity, to elucidate the mechanisms of action performed and to examine the *in vivo* antitumor action of the essential oil of *C. articulatus* rhizome on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **METHODS:** *C. articulatus* essential oil was obtained by hydrodistillation and its composition qualitatively and quantitatively evaluated by gas chromatography. Cytotoxic activity was measured against different cancerous cell lines (B16F10, HCT116, HepG2, HL-60 and MCF-7) and one non-cancerous cell line (MRC-5) by the alamar blue assay, at 72h. Next, HepG2 cells were evaluated after treatments for 24, 48 and 72h using different concentrations of the essential oil (12.5, 25 and 50 µg/mL), to measure intact cells, by trypan blue exclusion assay, followed by a morphological evaluation. The evaluation of the oil treatment impact on cell cycle evolution and determination of annexin V-FITC/propidium iodide labeled cells were performed by flow cytometry. The antitumor efficacy and toxicity of the treatment was evaluated in a heterotopic xenograft model in C.B-17 SCID mice, inoculated with HepG2 cells. **RESULTS:** The essential oil of *C. articulatus* was predominantly composed of sesquiterpenes, and muskatone, cyclocolorenone, α -pinene, pogostol, α -copaene and caryophyllene oxide as major substances. Potent cytotoxic activity was found in HepG2 cells ($IC_{50} = 28.5 \mu\text{g/mL}$), with reduction in the number of intact cells after 48 and 72h of treatment, and morphological changes consistent with apoptosis. The oil led to a significant increase in the number of cells in the G₂/M phase of the cell cycle, followed by internucleosomal DNA fragmentation. Treatment resulted in an increase in annexin V-FITC labeled cells, suggesting apoptotic cell death. In an *in vivo* model, the oil resulted in shrinkage of tumor development, with up to 50% inhibition rates, with few toxicity events. **CONCLUSIONS:** *C. articulatus* rhizome essential oil is a potential candidate for the development of a new chemotherapeutic strategy for hepatocellular carcinoma, as it induces cytotoxic activity in the HepG2 cell line, mediated by cell cycle arrest in G₂/M, fragmentation of intranucleosomal DNA content and increased externalization of phosphatidylserine, besides inhibiting tumor development in xenograft model.

Keywords: Hepatocellular Carcinoma, *Cyperus articulatus*, HepG2, Essential Oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Efeito da utilização do óleo essencial obtido do rizoma de <i>Cyperus articulatus</i> na viabilidade de células HepG2, mensurado pelo ensaio de exclusão com azul tripan, após tratamentos por 24, 48 e 72 horas.	35
Figura 2	Micrografias ópticas de células HepG2 após tratamento com o óleo essencial do rizoma de <i>C. articulatus</i> e coradas por panótico rápido.	37
Figura 3	Histogramas representativos da análise de distribuição do conteúdo de DNA no ciclo celular de células HepG2 após tratamento com óleo essencial (OE) do rizoma de <i>Cyperus articulatus</i> .	39
Figura 4	Efeito do óleo essencial do rizoma de <i>Cyperus articulatus</i> sobre a viabilidade de células HepG2, determinado por citometria de fluxo, usando anexina V-FITC/iodeto de propídio, após 24 e 48 h de incubação.	40
Figura 5	<i>Dotplots</i> representativos do efeito do óleo essencial (OE) do rizoma de <i>Cyperus articulatus</i> no perfil de morte celular das células HepG2 após tratamento.	41
Figura 6	Efeito antitumoral do óleo essencial do rizoma de <i>Cyperus articulatus</i> em camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.	42
Figura 7	Fotomicrografias representativas dos tumores HepG2 tratados com óleo essencial do rizoma de <i>Cyperus articulatus</i>	45
Figura 8	Fotomicrografias representativas dos órgãos dos animais tratados com o óleo essencial do rizoma de <i>Cyperus articulatus</i> .	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.	26
Tabela 2	Descrição do tratamento nos grupos experimentais <i>in vivo</i> .	30
Tabela 3	Composição química do óleo essencial do rizoma de <i>Cyperus articulatus</i> .	32
Tabela 4	Atividade citotóxica dos tratamentos em diferentes linhagens celulares.	33
Tabela 5	Efeito do óleo essencial do rizoma de <i>Cyperus articulatus</i> na distribuição do conteúdo de DNA de células HepG2.	38
Tabela 6	Efeito do óleo essencial de <i>Cyperus articulatus</i> na sobrevida, massa corpórea e massa relativa dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.	43
Tabela 7	Efeito do óleo essencial de <i>Cyperus articulatus</i> nos parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.	43

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

5-FU	5-fluorouracil
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACS	<i>American Cancer Society</i>
AMN-3	Linhagem de Adenocarcinoma Mamário Murino
ANOVA	Análise de Variância
AP	rea Proporcional
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B16F10	Linhagem de Melanoma Murino
BEL-7402	Linhagem de Hepatoma Celular
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CI	Concentrao Inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	cido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDTA	cido Etilenodiamino Tetra-acético
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundao Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GBM	Linhagem de Glioblastoma Multiforme
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Deteco por Ionizao de Chama
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada  Espectrometria de Massa
GLOBOCAN	Observatório Global do Câncer
HBV	Vírus da Hepatite B
HCT116	Linhagem de Carcinoma de Cólon Humano
HCV	Vírus da Hepatite C
HE	Hematoxilina e Eosina
HeLa	Linhagem de Carcinoma Cervical Humano
HEp-2	Linhagem de Carcinoma Epidermóide de Laringe
HepG2	Linhagem de Carcinoma Hepatocelular Humano
HL-60	Linhagem de Leucemina Promielocítica Humana
HT29	Linhagem de Adenocarcinoma Colorretal
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas
IP	Iodeto de Propídio
IR	ndice de Reteno
L1210	Linhagem de Leucemina Linfocítica Murina

m/m	Massa/massa
MCF-7	Linhagem de Adenocarcinoma de Mama Humano
MCV	Volume Corpuscular Médio
mm ³	Milímetro Cúbico
MRC-5	Fibroblasto de Pulmão Humano
N2a-NB	Linhagem de Neuroblastoma Murino
NAFLD	Esteatose Hepática Não Alcoólica
Nº	Número
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Ácido Periódico-Schiff
PC-3	Linhagem de Adenocarcinoma de Próstata
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotação por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCID	Imunodeficiência Combinada Grave
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SW480	Linhagem de Adenocarcinoma de Cólon
TR	Tempo de Retenção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	ASPECTOS BIOLÓGICOS DO CÂNCER.....	14
1.2	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	17
1.3	CARCINOMA HEPATOCELULAR	18
1.4	OPORTUNIDADES QUIMIOTERÁPICAS EM CÂNCER.....	20
1.5	<i>Cyperus articulatus</i>	21
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	HIPÓTESE.....	23
4	OBJETIVOS	23
4.1	OBJETIVO GERAL.....	23
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.1	MATERIAL BOTÂNICO	24
5.1.1	<i>Coleta de amostras de Cyperus articulatus</i>	24
5.1.2	<i>Extração do Óleo Essencial e Análise Química</i>	24
5.2	CÉLULAS E CULTIVO CELULAR.....	25
5.3	ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE POR ALAMAR BLUE.....	26
5.4	ENSAIOS DE PADRÃO DE MORTE E MECANISMOS DE AÇÃO	27
5.4.1	<i>Ensaio de Exclusão por Azul Tripán</i>	27
5.4.2	<i>Ensaio para Análise Morfológica</i>	27
5.4.3	<i>Ensaio de Determinação do Ciclo Celular e Fragmentação do DNA</i>	28
5.4.4	<i>Ensaio de Marcação com Anexina V/Iodeto de Propídio</i>	28
5.5.	ENSAIO DE EFICÁCIA ANTITUMORAL <i>in vivo</i>	29
5.5.1	<i>Considerações Éticas</i>	29
5.5.2	<i>Delineamento Experimental</i>	29
5.5.3	<i>Análise de Toxicidade Sistêmica</i>	30
5.5.4	<i>Análise Histopatológica</i>	30
5.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
6	RESULTADOS.....	31
6.1	ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO RIZOMA DE <i>Cyperus articulatus</i>	31
6.2	EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cyperus articulatus</i> NA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS	33

6.3	EFEITO DO TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2	34
6.4	CONSEQUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2.....	36
6.5	IMPACTO DO TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS HEPG2.....	38
6.6	EFEITO DOS TRATAMENTOS NO PERFIL DE MORTE CELULAR.....	39
6.7	EFEITO DA EFICÁCIA ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DO RIZOMA DE <i>C. articulatus</i>	41
6.7.1	<i>Efeito do óleo essencial do rizoma de Cyperus articulatus na toxicidade sistêmica de camundongos inoculados com células HepG2.....</i>	42
6.7.2	<i>Análise histopatológica dos tumores HepG2 após o tratamento com o óleo essencial do rizoma de C. articulatus</i>	44
6.7.3	<i>Análise histopatológica dos órgãos coletados após o tratamento com o óleo essencial do rizoma de C. articulatus</i>	44
7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS BIOLÓGICOS DO CÂNCER

Neoplasia é um termo designado para caracterizar um conjunto de células que sofreram um evento de transformação, adquirindo características que alteram o padrão de crescimento e divisão celular, possibilitando a formação de massas tumorais (MIERKE, 2015). Esta condição pode ser desenvolvida em diversos tipos celulares do corpo, classificando-se como um evento benigno quando as células apresentam poucas alterações em nível genético, com proliferação geralmente ocorrendo de forma lenta e razoavelmente organizada e boa demarcação em relação a áreas do tecido não neoplásico. Um tumor benigno geralmente não ultrapassa os limites teciduais do sítio em que foi originado e raramente incorre em risco à saúde humana (COLEMAN, 2018).

Por sua vez, neoplasias malignas, também designadas como câncer, compreendem um grupo de mais de 277 doenças em que, ao sofrerem alterações em genes reguladores do processo de replicação, as células perdem os mecanismos normais de controle homeostático, alterando os processos de sinalização, diferenciação e sobrevivência (HASSANPOUR; DEGHANI, 2017; ACS, 2018; SANCHEZ-VEGA et al., 2018). Esses eventos de malignidade conferem às células a agressiva capacidade de infiltração e invasão de tecidos normais circundantes, permitindo a colonização, sem finalidade biológica, de áreas próximas ou distantes no organismo (CHAFFER; WEINBERG, 2011; COLEMAN, 2018).

Não é possível determinar as causas exatas para o desenvolvimento dos eventos de malignidade em todas as neoplasias. De fato, o câncer é classificado como uma doença de etiologia multifatorial (CARBONE; PASS, 2004). Em geral, os elementos causais estão divididos entre intrínsecos e não intrínsecos (WU et al., 2018).

Fatores intrínsecos são aqueles não passíveis de modificação, estando relacionados a erros genéticos aleatórios durante a replicação do DNA, podendo ocorrer em qualquer indivíduo, como resultado da taxa de erro replicativo comum à espécie (PODOLSKIY; GLADYSHEV, 2016; ZHU; WU; HANNUN, 2017). Fatores não intrínsecos, por sua vez, dividem-se em dois subgrupos. Os não intrínsecos endógenos são aqueles internos, particulares a um indivíduo e parcialmente modificáveis – como particularidades na imunidade, níveis hormonais, capacidade do maquinário reparador do DNA, idade biológica e susceptibilidade genética (WU et al., 2018). Por sua vez, os não intrínsecos exógenos, incluem fatores totalmente externos, como carcinógenos físicos, químicos e biológicos, além de elementos

associados ao estilo de vida, como fumo, abuso de álcool, desequilíbrios na dieta, inatividade física, sobrepeso e obesidade (WU et al., 2018; BABA; CÂTOI, 2007; WOGAN, 2004; REYNOLDS; DONOHOE; DOYLE, 2011).

Independente do fator etiológico, a carcinogênese representa um processo complexo e longo, dividido em três estágios fundamentais - iniciação, promoção e progressão (COLE; KRAMER, 2015). A iniciação é a etapa de modificação estrutural dos genes ou na expressão destes, criando o potencial para o desenvolvimento neoplásico da célula afetada e a subsequente transformação da sua progênie (GRIZZI, 2006). Quando os mecanismos de reparo ou de bloqueio não agem sobre a célula iniciada, o estágio de promoção segue. Este é um estágio prolongado e imediatamente anterior à malignidade, onde as células iniciadas são selecionadas, acumulam-se à medida que o agente oncopromotor continua a agir sobre elas, promovendo expansão clonal (MARKS; FÜRSTENBERGER; MÜLLER-DECKER, 2007; ABEL; DIGIOVANNI, 2014).

Por fim, a progressão compreende o estágio onde a célula já apresenta maturidade na transformação maligna, com alterações genéticas e fenotípicas que garantem a desregulação das vias de sinalização bioquímica associados à proliferação e sobrevivência (COLE; KRAMER, 2015). Neste estágio as células podem acumular novas mutações e sofrer modificações que garantam o desenvolvimento e avanço tumoral (ARVELO; SOJO; COTTE, 2016).

Desta forma, durante o processo oncogênico as diversas transformações genéticas sofridas por uma célula garantem a aquisição de características essenciais para o seu estabelecimento como uma unidade neoplásica maligna. Algumas dessas características incluem a sustentação da sinalização proliferativa, imortalidade replicativa, evasão aos supressores de crescimento, resistência à morte programada, indução angiogênica, ativação da invasão e metástase, desregulação do metabolismo energético, escape da eliminação imune e criação de um ambiente inflamatório favorável ao crescimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Adicionalmente, a instabilidade genética e acúmulos mutacionais nas células cancerígenas conferem uma vantagem seletiva a subclones, gerando tumores heterogêneos, permitindo o crescimento e eventual dominância em um ambiente tecidual (ABDEL-RAHMAN, 2008; MOON; LU; MOON, 2019).

Como unidades funcionais bem organizadas, as células apresentam diversos mecanismos protetores contra os efeitos danosos das mutações. Assim, uma série de alterações genéticas são essenciais para culminar na transformação de uma célula normal em um tumor

maligno (JAKÓBISIAK; LASEK; GOŁĄB, 2003). Dentre essas alterações, dois grupos de genes reguladores do crescimento estão no cerne do processo do desenvolvimento neoplásico.

Os proto-oncogenes são genes altamente conservados e associados ao controle do crescimento celular e proliferação (LEE; MULLER, 2010). Quando mutados, no entanto, esses genes assumem a função de oncogenes, cujo produtos são a superexpressão de oncoproteínas idênticas aquelas geradas pelas formas não mutadas dos genes, ou oncoproteínas com pequenas diferenças estruturais. Como as mutações de ganho funcional que geram os oncogenes agem de forma dominante, o descontrole da proliferação das células mutadas é induzido eficientemente (LODISH et al., 2000).

Em contraste, os genes supressores de tumor normalmente atuam como inibidores da proliferação celular. Quando mutações de perda funcional atingem os dois alelos destes genes, proteínas que regulam o ciclo celular, proteínas do *checkpoint*, proteínas que promovem apoptose e enzimas que participam do reparo de DNA são inibidas, permitindo que eventos mutacionais não sejam reparados e, como resultado, acumulem-se (LODISH et al., 2000; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Além das mutações somáticas, evidências recentes têm trazido à tona a importância da epigenética nos eventos de carcinogênese (CHIK; SZYF; RABBANI, 2011). Mudanças químicas não estruturais no DNA, como acetilação, fosforilação e metilação, associados a modificações de histonas, são apontados como eventos envolvidos na iniciação e progressão de diversos tipos de neoplasias (SHARMA; KELLY; JONES, 2010). É digno de nota também o papel dos microRNAs no ambiente citoplasmático como moléculas regulatórias em neoplasias de pulmão, mama, fígado, cérebro, cólon e leucemia (SVORONOS; ENGELMAN; SLACK, 2016). As diferenças de expressão dessas moléculas, como a superexpressão do *mir-17-92* ou a hipossupressão do *let-7*, podem torná-los funcionalmente similares a oncogenes e genes supressores tumorais desregulados, impulsionando os mecanismos pró-tumor (ZHANG, et al., 2007; ZHOU; LIU; CAO, 2017; SVORONOS; ENGELMAN; SLACK, 2016).

Em última análise, apesar da complexidade molecular e da heterogeneidade celular neoplásica no contexto tumoral, os cânceres são entendidos atualmente como doenças de microambiente (WANG et al., 2017). Inúmeras células do tecido normal adjacente ao parênquima tumoral, bem como células derivadas da medula óssea, são recrutadas e modificadas, passando a atuar como estroma associado ao tumor, o qual mantém um ambiente propício ao avanço neoplásico (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Fibroblastos, células endoteliais, pericitos e macrófagos são alguns dos tipos celulares que constituem o repertório não neoplásico adjacente ao tumor. Estes mantêm uma estrita comunicação com as células

neoplásicas, mediando a persistência do tumor *in loco*, e promovendo os mecanismos necessários para as modificações epitélio-mesênquima, que garantem motilidade as células neoplásicas, além do preparo dos nichos metastáticos (HANAHAN; COUSSENS, 2012; LIU et al., 2019; LIN; XU; LAN, 2019; HIDA et al., 2018).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

As altas taxas de mortalidade e incidência associadas ao câncer fazem deste um problema reconhecidamente de saúde pública em todo o mundo. Globalmente, as neoplasias malignas são responsáveis por um em cada seis óbitos, ocupando a segunda posição entre as doenças que mais matam (OMS, 2018; ACS, 2018). Espera-se, no entanto, que ao longo do século XXI o câncer torne-se a principal causa de morte entre as doenças e agravos não transmissíveis, de forma mundial (BRAY et al., 2018).

Em 2018, o Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN), da Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo, resultando em 9,5 milhões de mortes. Os cânceres de pulmão, brônquios e traqueia; mama; cólon e reto; e próstata foram apontados como os mais incidentes para aquele ano, representando, respectivamente, 11,6%, 11,6%, 10,2% e 7,1% dos casos registrados (BRAY et al., 2018). A estimativa, contudo, indica que cerca de 29 milhões de novos casos de neoplasias malignas serão diagnosticados em 2040, resultando em 16 milhões de mortes (OMS, 2019a).

Esse aumento acentuado na carga global está diretamente associado ao crescimento e envelhecimento da população, bem como a alteração no comportamento da mesma, especialmente em países de baixa e média renda (KANAVOS, 2006; TORRE et al., 2016). Nestes países, muitos dos fatores de risco para o estilo de vida, como uso de tabaco, álcool, mudanças na dieta, inatividade física e excesso de peso corporal, são potencializados com a transição econômica, industrialização e mecanização do trabalho (GELBAND et al., 2007; TORRE et al., 2016).

No Brasil, projeções divulgadas pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimam 625 mil novos casos de câncer por ano, para o triênio 2020-2022. Entre os homens as neoplasias mais comuns serão próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão, brônquios e traqueia (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%). Para as mulheres, mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão, brônquios e traqueia (5,6%) e tireoide (5,4%) são reportadas como as mais incidentes (BRASIL, 2019). Em 2018, o número de óbitos decorrentes de câncer registrados no Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), do Ministério da Saúde, foi de 224.712 casos (INCA, 2020a).

1.3. CARCINOMA HEPATOCELULAR

O Carcinoma Hepatocelular (CHC) é o câncer hepático primário mais comum, correspondendo a quase 90% dos casos diagnosticados, e um dos mais agressivos entre as neoplasias (FORNER; REIG; BRUIX, 2018). Dados do GLOBOCAN apontam esta como a sexta neoplasia em incidência no mundo e a quarta em número de mortes (BRAY et al., 2018). Assim como as demais neoplasias, é esperado que o impacto do CHC continue a crescer anualmente, ultrapassando 1,2 milhões de mortes em 2040 (OMS, 2019b). No Brasil a incidência do CHC é baixa, no entanto, devido a sua agressividade, as taxas de letalidade são elevadas. Dados do SIM apontam que 10.551 mortes foram registradas no país em 2018 devido ao carcinoma hepático (INCA, 2020b).

O CHC se desenvolve especialmente em pacientes que já apresentam algum tipo de agressão crônica nas células hepáticas, ocorrendo, na maioria dos casos, associado a cirrose (VILLANUEVA, 2019). Infecções crônicas por HBV (Vírus da Hepatite B) e HCV (Vírus da Hepatite C) são retratados como os principais fatores de risco globalmente (ACS, 2018). Adicionalmente, também são de importância a cirrose decorrente do consumo excessivo de álcool, a esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) e a contaminação por aflatoxina B1, produzida por fungos presentes em grãos e cereais mal armazenados (FORNER; REIG; BRUIX, 2018; VILLANUEVA, 2019). Outros fatores incluem algumas condições, como hemocromatose, além de obesidade, diabetes tipo 2 e fumo (FORNER; REIG; BRUIX, 2018; LONDON et al., 2018).

Como mecanismo de compensação dos danos promovidos pelas lesões metabólicas, oxidativas, inflamatórias e necróticas durante a cirrose, os fígados lesionados tendem a promover uma regeneração compensatória (GHOURI; MIAN; ROWE, 2017). Ao longo dos anos, no entanto, a rotatividade aumentada dos hepatócitos em tais condições hostis promove o acúmulo de erros e mutações genéticas. Dentre estas, a mais frequente (60% dos casos) é a mutação no promotor do *TERT*, um importante sítio de inserção para o genoma do HBV, que impulsiona a produção da telomerase e contribui para a imortalização da célula (SCHULZE; NAULT; VILLANUEVA, 2016; JHUNJHUNWALA et al., 2014). Outras mutações de importância ocorrem no *TP53*, desregulando o ciclo celular; em *CTNNB1* e *AXIN1*, envolvidos na ativação da via WNT; em *ARID1A* e *ARID2*, genes que controlam o remodelamento da cromatina; no proto-oncogene *c-MET*, promovendo o crescimento dos hepatócitos; além da ativação das vias de sinalização MAPK e mTOR (THORGEIRSSON; GRISHAM, 2002; JHUNJHUNWALA et al., 2014; VILLANUEVA, 2019).

Por ser uma doença com avanço silencioso e sem sintomas aparentes, o diagnóstico do CHC é tardio e por isso o tratamento é dificultado. Se identificado em estágios iniciais, quando não há alterações nas funções hepáticas e até três nódulos menores que 3 cm são diagnosticados, sem invasão vascular, a remoção por cirurgia é a estratégia recomendada, podendo ser aplicado também o transplante do órgão para tumores diminutos e sem metástase (KINOSHITA et al., 2015; KOW, 2019). Neste estágio a regressão tumoral também pode ser obtida por injeções percutâneas com álcool ou ácido acético e ablação por radiofrequência (WEIS et al., 2015; RHIM; LIM, 2010).

A quimioembolização, que envolve a entrega de um quimioterápico combinado a um agente embolizador, é a estratégia padrão para o CHC em fase intermediária, correspondente aos pacientes com nódulos múltiplos, sem invasão vascular e com especificação A ou B na classificação de Child-Pugh (LENCIONI; PETRUZZI; CROCETTI, 2013; KINOSHITA et al., 2015). Por sua vez, em estágios mais avançados, onde o paciente apresenta metástases extra-hepáticas, gradação A ou B para a classificação Chil-Pugh, acompanhado de *performance status* 1 a 2, o tratamento sistêmico é o único aplicado (KARADEMIR, 2018; RIMASSA; PRESSIANI; MERLE, 2019).

O sorafenib representa a estratégia terapêutica de primeira escolha para quimioterapia do CHC, atuando na inibição de proteínas quinases envolvidas nas vias de angiogênese e proliferação tumoral (CERVELLO et al., 2012). Seu uso está associado ao aumento, em alguns meses, na sobrevida global dos pacientes; no entanto, os benefícios não são sustentados a longo prazo, havendo expressiva descontinuidade do tratamento devido aos efeitos adversos, como reações dermatológicas e disfunção hepática (RIMASSA; PRESSIANI; MERLE, 2019). Adicionalmente, não são incomuns os eventos de desenvolvimento de resistência a esta terapia (SUN; LIU; MING, 2017; NIU et al., 2017; MÉNDEZ-BLANCO et al., 2018).

Apesar dessas dificuldades, nenhuma substância foi capaz de gerar benefícios no tratamento do CHC superiores ao sorafenib nos últimos anos. Em 2018, entretanto, por não apresentar inferioridade na sobrevida global dos pacientes, o lenvatinib foi aprovado como uma opção adicional de primeira escolha (AL-SALAMA; SYED; SCOTT, 2019). No entanto, devido às dificuldades persistentes na quimioterapia, estratégias sistêmicas de segunda linha, como regorafenib, nivolumab e pembrolizumab, receberam aprovação acelerada pela FDA (RIMASSA; PRESSIANI; MERLE, 2019).

Esses esforços indicam a grandeza do problema associado a terapia quimioterápica em CHC. Contudo, apesar dos avanços, o câncer de fígado continua como um dos mais fatais, com

menos de 20% dos pacientes apresentando taxa de sobrevida em 5 anos, mesmo em países desenvolvidos (ACS, 2018).

1.4. OPORTUNIDADES QUIMIOTERÁPICAS EM CÂNCER

Devido à sua importância na saúde pública, as pesquisas em tratamento oncológico avançaram nas últimas décadas (ECKHOUSE; LEWISON; SULLIVAN, 2008). Como resultado, diversos novos mecanismos de ação e melhorias nas estratégias terapêuticas convencionais têm sido propostos para o tratamento dessas doenças (PUCCI; MARTINELLI; CIOFANI, 2019). De fato, avanços em prevenção, diagnóstico e tratamento culminaram em um decréscimo de cerca de 25% na mortalidade do câncer, quando comparados os picos máximos das taxas de morte entre 1990 e 2014 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

As quimioterapias se apresentam como uma das mais disseminadas ferramentas de tratamento anticâncer em todo mundo (DEVITA; CHU, 2008; KUMMAR, 2006). Seu uso consiste na administração de fármacos de diversas classes farmacológicas e estruturais, atuando nos processos de crescimento e divisão celular de forma ciclo celular específico ou não (LUO; LEVERSON, 2005; MILLS; KOLB; SAMPSON, 2018; BAGNYUKOVA et al., 2010).

No entanto, poucas categorias de fármacos possuem um índice terapêutico mais estreito, com maior potencial de resultar em efeitos adversos e rapidamente selecionar células resistentes, que os agentes quimioterápicos antineoplásicos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Nota-se, portanto, a necessidade do estudo de novos fármacos com a finalidade de tratar com maior eficácia os diversos tipos de câncer. Neste sentido, os produtos naturais despontam como um promissor instrumento (CRAGG; NEWMAN, 2005; KOOTI et al., 2017).

Historicamente as capacidades medicinais dos produtos naturais são reconhecidas nas mais diversas culturas, possibilitando o uso disseminado destes na medicina tradicional popular (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Essas observações despertaram o interesse pela busca de novas moléculas e substâncias com potencial antitumoral, principalmente aquelas derivadas de plantas (KURUPPU; PARANAGAMA; GOONASEKARA, 2019). O Instituto Nacional do Câncer, nos EUA, concluiu em um estudo prospectivo que 3000 espécies de plantas apresentam atividade anticâncer, identificando uma alternativa real e comprovada para o desenvolvimento de novas ferramentas quimioterápicas (GRAHAM et al., 2000). Nesse sentido, mais de 60% dos agentes antineoplásicos atualmente utilizados são derivados de fontes naturais (KHAN, 2014; CRAGG; NEWMAN, 2005).

Dentre estas novas ferramentas de estudo, os óleos essenciais (OE) apresentam algumas características farmacológicas interessantes. OE são definidos como misturas complexas de hidrocarbonetos, especialmente mono- e sesquiterpenos, e seus derivados oxigenados, juntamente com aldeídos alifáticos, álcoois e ésteres, que integram o metabolismo secundário de plantas (SHARIFI-RAD et al., 2017). Essas substâncias são produzidas nos tricomas glandulares e outras estruturas secretórias, especialmente nas flores e folhas, exercendo o papel ecológico protetor de afastar pragas e atrair agentes polinizadores (BUTNARIU; SARAC, 2018). São reportadas atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias decorrente do uso de óleos essenciais (ELSHAFIE; CAMELE, 2017).

No entanto, embora os estudos da aplicação de OE como agentes antitumorais ainda sejam recentes, alguns grupos demonstraram o potencial terapêutico do seu uso. Elshafie e colaboradores (2017) atestaram a atividade citotóxica do OE de *Origanum vulgare* (orégano) e seus principais constituintes sobre a linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2). Por sua vez, o uso do OE de *Citrus limettioides* (lima-da-pérsia) na linhagem de câncer de cólon, SW480, atuou com eficácia por promover a morte apoptótica nestas células (JAYAPRAKASHA et al., 2013). Desta forma, os materiais extraídos e/ou modificados a partir de produtos naturais, incluindo os OE, desempenham uma vasta oportunidade para o descobrimento de novos agentes terapêuticos em câncer.

1.5. *Cyperus articulatus*

Cyperus articulatus L., popularmente denominada pripioca ou piri-piri, é uma erva aromática, pertencente à família Cyperaceae Juss e subfamília Cyperoideae (ALVES et al., 2015). É uma planta com tolerância a solos ácidos, crescendo em áreas úmidas, pantanosas ou alagadas, como margens de rios e córregos, geralmente em baixas altitudes (ROCHA, 2008). A espécie, nativa da região amazônica, possui ampla distribuição na América Latina, podendo ser encontrada também em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo, como África, sul da Ásia, norte da Austrália e sudeste dos Estados Unidos (TAYLOR, 2006).

C. articulatus é uma planta perene, similar ao junco, que cresce em aglomerados de rizoma espessos, ligados por tubérculos. Do seu rizoma despontam longos escapos lisos e ocos, de formato cilíndrico a trígono e geralmente septados quando secos, podendo atingir de 0,3 a 2,5 m de altura. Nas regiões aéreas apresenta brácteas avermelhadas, lanceoladas e multinérvias, além de folhas com lâminas foliares ausentes (ROCHA, 2008).

Relatos sugerem o uso milenar de espécies do gênero *Cyperus* na perfumaria (ZOGHBI; GUILHON; ANDRADE, 2008). De fato, a utilização do OE de *C. articulatus* desperta um forte

interesse da indústria cosmética, devido ao seu aroma agradável e bem pronunciado, o que tem alavancado o crescimento econômico de muitas comunidades nortenhãs do Brasil (NICOLI et al., 2006). No entanto, a erva também tem despertado o interesse científico devido ao seu uso disseminado na medicina tradicional de várias comunidades do mundo (TAYLOR, 2006).

Dentre os efeitos farmacológicos já reportados na literatura para *C. articulatus* destacam-se a ação anticonvulsiva (BUM et al., 2001; BUM et al., 2003), propriedades sedativas (RAKOTONIRINA et al., 2001), ação anti-inflamatória (KIUCHI et al. 1983), antioxidante (DESMARCHELIER et al., 1997), antimicrobiana (MONGELLI et al., 1995; DUARTE et al., 2005; OLADOSU et al., 2011) e antiparasitária (RUKUNGA et al., 2008; RUKUNGA et al., 2009; METUGE et al., 2014a).

No contexto antineoplásico, relatos apontam para o uso do suco do rizoma de *C. articulatus* como tratamento para o câncer de orofaringe na medicina tradicional peruana (TAYLOR, 2006). Por sua vez, uma nanoformulação carregando o OE da planta passou por uma triagem preliminar em células de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), indicando uma aparente atividade citotóxica de *C. articulatus* quando usado de forma livre ou nanoencapsulado (KAVAZ; IDRIS; ONYEBUCHI, 2019). Com isso, efeitos similares podem ser encontrados em outros modelos de neoplasias malignas, abrindo espaço para utilização de uma planta tão disseminada no Brasil como um possível agente quimioterápico.

2. JUSTIFICATIVA

Em todo o mundo é esperado que o número de mortes associados ao câncer continue a crescer, agravando este problema de saúde pública (OMS, 2019a). Por isso, a pesquisa em oncologia desempenha um papel fundamental para o entendimento da patogênese e desenvolvimento e/ou incrementação de estratégias terapêuticas para o combate deste grupo de doenças (ECKHOUSE; LEWISON; SULLIVAN, 2008; PUCCI; MARTINELLI; CIOFANI, 2019). Neste sentido, os produtos naturais representam uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos fármacos, correspondendo a mais da metade dos agentes antineoplásicos no cenário clínico atual (KHAN, 2014; CRAGG; NEWMAN, 2005).

C. articulatus tem despertado o interesse farmacológico pelas propriedades medicinais comprovadas e pelo seu uso na medicina tradicional de alguns povos, sendo reportada sua atividade citotóxica frente ao adenocarcinoma de mama (TAYLOR, 2006; KAVAZ; IDRIS; ONYEBUCHI, 2019). No entanto, não existem relatos sobre os mecanismos de ação

desempenhados pela erva para exercer ação antineoplásica em quaisquer tipos histológicos de câncer. Desta forma, este trabalho tem como intuito analisar de forma inédita a ação do OE do rizoma de *C. articulatus* em células do carcinoma hepatocelular, visando contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias quimioterápicas para este câncer de prognóstico ruim e elevada mortalidade (FORNER; REIG; BRUIX, 2018).

3. HIPÓTESE

O óleo essencial do rizoma de *C. articulatus* é citotóxico em linhagens neoplásicas, altera mecanismos celulares destas *in vitro* e apresenta efetividade em modelo tumoral *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico e antitumoral do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus* em modelo de carcinoma hepatocelular humano.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial citotóxico do óleo essencial de *C. articulatus* em diferentes linhagens tumorais e em linhagem não tumoral;
- Analisar o impacto do tratamento na viabilidade celular e avaliar seu efeito sobre a morfologia das células;
- Avaliar a influência do óleo essencial na evolução do ciclo celular;
- Avaliar o efeito do óleo essencial no mecanismo de morte celular, quanto às vias apoptótica e necrótica;
- Examinar a ação antitumoral e o efeito tóxico do óleo essencial em modelo *in vivo*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. MATERIAL BOTÂNICO

Os procedimentos de ordem botânica e química foram realizados pelo Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen, do grupo de pesquisa em metabolômica e espectrometria de massa, da Universidade do Estado do Amazonas.

5.1.1. *Coleta de amostras de Cyperus articulatus*

Os rizomas de *C. articulatus* foram coletados de uma área privada de vegetação preservada, localizada na cidade de Rio Preto da Eva, no Amazonas, Brasil (2° 43' 11.2" S e 59° 31' 08.5" O), pelo Dr. Hector Koolen. A autenticidade do material foi confirmada por comparação com um espécime de referência, depositado sob o número #24945, no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA). Este trabalho foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob inscrição A50A14E, e realizado sob as leis brasileiras de acesso aos recursos genético.

5.1.2. *Extração do Óleo Essencial e Análise Química*

As amostras da planta foram seccionadas em diferentes frações anatômicas, sendo o rizoma utilizado para a obtenção do óleo essencial utilizado neste estudo. O material vegetal fresco foi então diretamente extraído pelo método de hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger. Para tanto, 750 g de material triturado foram extraídos por um período de 4 h em 3000 mL de água ultrapura (18,2 MΩ). Em seguida, o OE obtido foi extraído três vezes com clorofórmio, seco sobre Na₂SO₄ anidro e filtrado através de uma membrana de nylon (tamanho de poro 0,22 μm, Whatman, Maidstone, Reino Unido).

A identificação dos constituintes químicos foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), com um equipamento modelo GCMS/QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar Rtx-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm, Restek). Hélio, a um fluxo de 1,02 mL/min, foi o transportador, e as injeções (1 μL) foram realizadas com soluções estoque do OE a 1,5 mg/mL em clorofórmio, com uma proporção de partição de 1:50. O programa de temperatura da coluna foi de 50 a 285 °C, havendo aumentos graduais de 3 °C/min. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram de 215 °C e 265 °C, respectivamente. Inicialmente, as identificações dos constituintes

basearam-se em comparações dos espectros obtidos com os armazenados na biblioteca da Wiley, 8ª edição (apenas semelhanças > 90% foram consideradas). As confirmações foram realizadas pelo cálculo dos índices de retenção (IR) de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963) em comparação a uma série homóloga constituída por hidrocarbonetos lineares, variando de $n\text{-C}_7$ a $n\text{-C}_{30}$. Uma análise semi-quantitativa foi realizada para obter a quantidade relativa de cada componente do OE. Para isso, foi aplicada cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID). Um sistema constituído por um aparelho GC2010 (Shimadzu) equipado com uma coluna capilar Rtx-5 foi utilizado nas mesmas condições da análise GC-MS. As quantidades relativas (%) foram calculadas em relação à área total do cromatograma em três repetições independentes.

5.2. CÉLULAS E CULTIVO CELULAR

Os ensaios de citotoxicidade subsequentes foram realizados utilizando diferentes linhagens de células neoplásicas obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, EUA) (**Tabela 1**). Para fins comparativos do efeito citotóxico e avaliação da seletividade do tratamento, uma linhagem não neoplásica foi incluída ao painel de células em estudo.

Todas as linhagens foram cultivadas em garrafas de poliestireno (75 cm³, volume de 250 mL) e mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, Gibco, Gaithersburg, MD, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Life Technologies, Gibco, Gaithersburg, MD, EUA) e 10 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil). As garrafas foram acondicionadas em estufa, a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

O crescimento celular e a necessidade de reposição de nutrientes foram analisados diariamente por observação das culturas utilizando microscópio óptico invertido. A manutenção das células se deu sempre que as culturas atingiram cerca de 80% de confluência da área total de crescimento, utilizando solução de tripsina EDTA a 0,25% (Life Technologies, Gibco, Gaithersburg, MD, EUA) para desvincular as células aderentes das garrafas. Todos os experimentos foram realizados durante a fase exponencial de crescimento das células.

Periodicamente as linhagens em teste foram submetidas a avaliação da presença de micoplasma utilizando um kit de detecção por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Células	Tipo Histológico	Fonte
<i>Linhagens Neoplásicas</i>		
B16F10	Melanoma Murino	ATCC
HCT116	Carcinoma de Cólon Humano	ATCC
HepG2	Carcinoma Hepatocelular Humano	ATCC
HL-60	Leucemina Promielocítica Humana	ATCC
MCF-7	Adenocarcinoma de Mama Humano	ATCC
<i>Linhagem Não Neoplásica</i>		
MRC-5	Fibroblasto de Pulmão Humano	ATCC

5.3. ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE POR ALAMAR BLUE

Para avaliar a capacidade citotóxica do OE do rizoma de *C. articulatus* sob os diferentes tipos celulares e mensurar a sua CI_{50} (concentração inibitória necessária para inibir 50% das células em proliferação) para cada linhagem, foi empregado o ensaio colorimétrico do alamar blue, utilizando seu ingrediente ativo, a resazurina. A resazurina é um corante azul não fluorescente, solúvel em água, não tóxico e permeável as membranas celulares que, quando no ambiente redutor metabolicamente ativo das células vivas, é reduzido a resorufina, de cor rosa e fluorescente, refletindo, portanto, a viabilidade das células (RAMBERSAD, 2012).

Neste ensaio, células aderentes das linhagens celulares listadas na Tabela 1 foram dispostas em placas de 96 poços, na densidade de $0,7 \times 10^5$ células/mL, em um volume de 100 μ L/poço, e incubadas por 24 horas em estufa, a 37 °C e 5% de CO_2 , para adesão celular. Após este período foi realizado o plaqueamento das células não aderentes (HL-60), na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL, em 100 μ L/poço. Imediatamente após, diferentes concentrações do óleo essencial (entre 0,39 e 50 μ g/mL) e dos controles positivos, doxorubicina (DOX, pureza \geq 95%, cloridrato de doxorubicina, Laboratory IMAS.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) e 5-fluorouracil (5-FU, pureza $>$ 99%; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) (entre 0,19 e 25 μ g/mL), foram adicionados aos poços e incubados por adicionais 72 horas. Todas as substâncias e o composto teste foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil), utilizado em uma concentração final máxima de 0,5% do volume de cada poço; esta mesma concentração do solubilizante foi adicionada aos poços não tratados, atuando como controle negativo.

Quatro horas antes do término do período de incubação das substâncias teste, 20 μ L da solução (0,312 mg/mL) de resazurina (Alamar Blue, Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, MO, EUA) foram adicionados aos poços. Ao final deste tempo as absorbâncias foram mensuradas

utilizando a leitora de placas Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), nos comprimentos de onda de 570 nm, para a forma reduzida do alamar blue, e 600 nm, para a forma oxidada.

5.4. ENSAIOS DE PADRÃO DE MORTE E MECANISMOS DE AÇÃO

Para os ensaios subsequentes, que avaliam os padrões mecanísticos associados a utilização do composto, foi utilizado apenas a linhagem neoplásica mais sensível ao tratamento com o OE. Nestes ensaios empregou-se a densidade de $0,7 \times 10^5$ células/mL para as etapas de plaqueamento celular, em placas de 24 poços, com volume de 2 mL/poço e período de incubação de 24 horas para aderência das células. Posteriormente, diferentes intervalos, entre 24 e 72 horas, foram empregados para ação do óleo essencial nas concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, baseados no valor de CI_{50} para a linhagem selecionada. DMSO (0,5%) foi utilizado como diluente das substâncias e controle negativo dos ensaios, e doxorrubicina (1 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo. Os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos ao menos três vezes.

5.4.1. *Ensaio de Exclusão por Azul Tripán*

Este ensaio emprega o uso de um corante, o azul tripan, como forma de determinar a quantidade de células viáveis em uma solução. É baseado no princípio de que células com descontinuidades membranares não são capazes de excluir o corante do seu interior, permitindo uma diferenciação visual entre células com membrana intacta e não intacta, que se coram em azul (STROBER, 2015).

Para esta avaliação, as células após tratamento (24, 48 e 72h) foram tripsinizadas. Aliquotas de 90 μL de células foram coletados de cada poço e adicionadas a 10 μL do corante. A contagem das células, considerando a diferença de coloração, foi realizada em câmara de Neubauer, por meio de microscópio óptico (Olympus CX41, Tóquio, Japão).

5.4.2. *Ensaio para Análise Morfológica*

A fim de observar possíveis alterações morfológicas resultantes dos tratamentos, as células foram dispostas sobre lamínulas de vidro, adicionadas aos poços das placas testes. Ao final dos períodos de adesão e tratamento por 24, 48 e 72h, as placas foram centrifugadas (1500 RPM/5 min) e o meio de cultura dos poços descartados. Em seguida, as células foram processadas com o conjunto para coloração Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, Brasil), o qual

inclui a ação sequencial das soluções de triarilmetano, xantenos e tiazinas. Por fim, após secagem em temperatura ambiente, as lâminulas carregando as células coradas foram montadas em lâminas de vidro utilizando Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e avaliadas quanto as suas características morfológicas através de microscopia óptica (Leica LMD 6500, Wetzlar, Alemanha).

5.4.3. *Ensaio de Determinação do Ciclo Celular e Fragmentação do DNA*

O conteúdo de DNA presente nas células sofre variações durante os diferentes estágios do ciclo celular. Essas variações podem ser mensuradas com o auxílio de sondas específicas que permitem a detecção de diferenças na ploidia do conteúdo genético entre as células em estágio pré-replicativo (G_0/G_1), replicativo (S) e pós-replicativo/mitótico (G_2/M) (CROWLEY, CHOJNOWSKI, WATERHOUSE, 2016). O iodeto de propídio (IP) é um agente fluorescente, com alta afinidade nuclear e cromossômica, que se intercala de forma estequiométrica ao DNA, sendo, portanto, amplamente utilizado para ensaios de avaliação do ciclo celular (BABES et al., 2018).

Após os diferentes tratamentos com as substâncias teste, o sobrenadante de cada duplicata foi coletado, os poços lavados com solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%) e as células tripsinizadas e separadas por centrifugação (1500 RPM/5 min). Às células foram acrescidos 300 μ L da solução de permeabilização/marcação (0,1 % de Triton X-100, 0,1% de citrato de sódio, 2 μ g/mL de IP e 100 μ g/mL de RNase, solubilizados em água destilada. Todos reagentes provenientes da Sigma-Aldrich Co), seguidos de 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, na ausência de luz. Imediatamente depois as células marcadas foram adquiridas em citômetro de fluxo (BD LSRFortessa), e quantificadas por meio do software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra. Análises do conteúdo de DNA e quantificação das células nas diferentes etapas do ciclo celular, excluindo os detritos celulares, foram realizadas empregando-se o software Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA).

5.4.4. *Ensaio de Marcação com Anexina V/Iodeto de Propídio*

Este ensaio se baseia na classificação das células em quatro diferentes perfis (células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose) através de diferenças detectadas na membrana plasmática das células. A sonda fluorescente anexina V-FITC se liga à fosfatidilserina externalizada na membrana plasmática das células em estágio inicial de

apoptose, enquanto o iodeto de propídio intercala-se ao DNA de células com comprometimento da integridade membranar, característicos dos estágios de necrose ou de apoptose tardia.

Assim, decorrido os períodos de tratamento, as células tripsinizadas, centrifugadas e lavadas com solução fisiológica, foram submetidas a marcação de acordo com as recomendações do *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). As células foram ressuspensas em 100 μL do tampão de ligação, acrescidos de 5 μL de anexina V-FITC e 5 μL de IP, seguido de incubação, na ausência de luz e a temperatura ambiente, por 15 minutos. Ao final, 400 μL de tampão de ligação foram adicionados a cada amostra, as células adquiridas e os eventos quantificados e analisados conforme descrito no item 5.4.2.

5.5. ENSAIO DE EFICÁCIA ANTITUMORAL *in vivo*

5.5.1. *Considerações Éticas*

Todas as diretrizes operacionais na habitação, rotina, manuseio e procedimentos experimentais com animais foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Instituto Gonçalo Moniz (IGM, FIOCRUZ, Bahia), sob a licença N° 006/2015.

5.5.2. *Delineamento Experimental*

Camundongos *Mus musculus*, fêmeas e isentos de patógenos, da linhagem C.B-17, apresentando imunodeficiência combinada severa (SCID), com 6 semanas de idade e peso médio de 18 g, foram mantidos em instalações apropriadas, com máximo de 5 animais por gaiola, ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso a água e alimento, no biotério do IGM.

A eficiência antitumoral foi avaliada em modelo de xenotransplante heterotópico, com inoculação subcutânea de 10^7 células/500 μL /animal, na axila esquerda de cinquenta camundongos. Os animais foram divididos em quatro grupos e tratados por via intraperitoneal, uma vez por dia, durante 21 dias consecutivos, conforme características apresentadas na Tabela 2. As doses foram selecionadas com base em trabalhos anteriores, utilizando óleos essenciais em modelos murinos portadores de tumor (FERRAZ et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015). Os tratamentos foram iniciados um dia após a inoculação das células.

Tabela 2. Descrição do tratamento nos grupos experimentais *in vivo*.

Grupos	Nº de Animais	Dosagem	Diluyente	Veículo	Volume de Injeção
DMSO (C. Negativo)	20	5%	-	Salina	200 µL
5-Fluorouracil	10	10 mg/kg	DMSO 5%	Salina	200 µL
OE <i>C. articulatus</i>	10	40 mg/kg	DMSO 5%	Salina	200 µL
OE <i>C. articulatus</i>	10	80 mg/kg	DMSO 5%	Salina	200 µL

No 22º dia, após anestesia com tiopental (80 mg/kg), amostras do sangue periférico foram coletadas da artéria braquial para análise hematológica. Os animais foram então eutanasiados por overdose anestésica, e os tumores, fígados, pulmões, rins e corações, excisados e pesados. O efeito dos tratamentos foi determinado como percentual da inibição do crescimento tumoral dos grupos de tratamento em relação ao controle negativo, DMSO.

5.5.3. *Análise de Toxicidade Sistêmica*

Cada animal foi pesado no início e final do experimento. A observação diária de aspectos como motricidade, tremores, piloereção, irritabilidade e morte foi realizada a fim de avaliar possíveis efeitos tóxicos dos tratamentos. Os órgãos coletados foram pesados e observados visualmente como forma de detecção de alterações morfológicas ou lesões. As análises hematológicas foram realizadas por aquisição do sangue coletado em hemocítmetro (Bayer, Leverkusen, Alemanha).

5.5.4. *Análise Histopatológica*

As seções dos órgãos e tumores coletados foram dispostas em grades para processamento histológico e mantidas em solução formol a 10%. Em seguida, foi realizado o processamento histológico, conforme procedimentos de rotina da Plataforma de Histotecnologia do IGM. Este processo consistiu em emblocamento das seções dos órgãos em parafina, cortes de 4 µm de espessura do material, disposição dos cortes em lâminas de observação e coloração das amostras por ácido periódico-Schiff (PAS), para os rins e fígados, e por hematoxilina e eosina (HE), para todas as amostras coletadas.

As amostras dos tumores foram digitalizadas pelo escaneador de lâminas Olympus VS120 (Olympus Co., Tóquio, Japão), no aumento de 40X, utilizando o software OlyVIA (Olympus Co., Tóquio, Japão). As análises investigativas de possíveis danos histológicos causados pelos tratamentos nos órgãos foram realizados por microscopia óptica, nos aumentos de 4X, 100X, 200X e 400X (quando necessário), por um patologista experiente.

5.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) ou CI_{50} e intervalo de confiança de 95%. O tipo de distribuição dos dados (se gaussiana ou não) foi determinado pelo método de Kolmogorov-Smirnov. A significância das diferenças nos resultados obtidos (controle negativo versus tratamento), levando-se em conta todos os grupos de um dado experimento, foi estimada pelo teste de ANOVA, para dados com distribuição gaussiana. A probabilidade das diferenças entre os resultados observados em diferentes grupos serem devido ao acaso foi avaliada pelo teste de Student Newman-Keuls. A CI_{50} foi calculada a partir de uma curva sigmoide de concentração-resposta com base nos dados da viabilidade celular. Todos os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prisma (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA). Diferenças estatísticas foram consideradas para *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO RIZOMA DE *Cyperus articulatus*

A recuperação de OE a partir do rizoma de *C. articulatus* foi de $0,58 \pm 0,04\%$ (m/m), na qual foi observada uma composição dominada por terpenóides (**Tabela 3**). Entre os diferentes tipos, foram identificados monoterpenos (hidrocarbonetos 14,59%; oxigenados 8,29%) e sesquiterpenos (hidrocarbonetos 8,98%; oxigenados 47,49%) e vestígios de diterpenos. As principais substâncias representativas dessa amostra de OE foram muscatona ($11,60 \pm 1,19\%$), ciclocolorenona ($10,30 \pm 1,02\%$), α -pineno ($8,26 \pm 0,74\%$), pogostol ($6,36 \pm 0,88\%$), α -copaeno ($4,83 \pm 0,45\%$) e óxido de cariofileno ($4,82 \pm 0,44\%$).

Tabela 3. Composição química do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus*.

Pico	Composto	TR (min)	IR	AP (%)	Pico	Composto	TR (min)	IR	AP (%)
1	α -Pineno	5,50	931	8,26 \pm 0,74	22	β -Copaen-4- α -ol	32,3	1570	4,74 \pm 0,40
2	Verbeneno	6,05	967	0,44 \pm 0,06	23	N. I.	37,7	-	0,72 \pm 0,04
3	β -Pineno	6,73	975	4,54 \pm 0,52	24	N. I.	38,3	-	1,82 \pm 0,15
4	<i>p</i> -Cimeno	8,31	1025	0,42 \pm 0,05	25	Espatuleno	39,0	1588	3,68 \pm 0,38
5	Limoneno	8,50	1028	0,93 \pm 0,11	26	N. I.	43,8	-	0,43 \pm 0,05
6	Isopinocarveol	13,1	1160	2,13 \pm 0,20	27	Globulol	44,9	1591	2,72 \pm 0,29
7	β -Felandre-8-ol	13,5	1163	0,32 \pm 0,02	28	N. I.	45,1	-	0,90 \pm 0,08
8	α -Felandre-8-ol	14,4	1168	0,81 \pm 0,10	29	N. I.	45,5	-	0,58 \pm 0,06
9	Terpino-4-ol	14,9	1174	0,22 \pm 0,05	30	Muscato	46,0	1681	11,60 \pm 1,19
10	α -Terpineol	15,5	1190	0,63 \pm 0,03	31	Ciperol	46,5	1684	1,84 \pm 0,15
11	Mirtenol	15,8	1198	3,47 \pm 0,37	32	N. I.	46,9	-	0,92 \pm 0,09
12	Verbenona	16,4	1205	0,71 \pm 0,08	33	Pogostol	47,2	1687	6,36 \pm 0,88
13	α -Copaeno	24,6	1375	4,83 \pm 0,45	34	N. I.	47,4	-	1,60 \pm 0,21
14	β -Elemeno	25,5	1394	0,35 \pm 0,02	35	N. I.	47,7	-	1,02 \pm 0,10
15	α -Gurjuneno	25,8	1409	1,55 \pm 0,17	36	N. I.	48,0	-	1,30 \pm 0,16
16	β -Cariofileno	26,1	1435	1,03 \pm 0,11	37	(<i>E,E</i>)-Farnesol	48,1	1740	1,43 \pm 0,15
17	β -Copaeno	27,8	1440	1,22 \pm 0,12	38	Ciclocolorena	48,4	1753	10,30 \pm 1,02
18	N. I.	28,9	-	0,84 \pm 0,05	39	N. I.	49,3	-	0,21 \pm 0,02
19	N. I.	29,9	-	0,15 \pm 0,01	40	N. I.	49,5	-	0,49 \pm 0,05
20	Óxido de Cariofileno	30,7	1550	4,82 \pm 0,44	41	N. I.	50,2	-	0,19 \pm 0,01
21	N. I.	31,4	-	1,51 \pm 0,11	42	(<i>E</i>)-Isogeraniol	51,6	1817	0,72 \pm 0,04
Total de Monoterpenos Hidrocarbonetos									14,59
Total de Monoterpenos Oxigenados									8,29
Total de Sesquiterpenos Hidrocarbonetos									8,98
Total de Sesquiterpenos Oxigenados									47,49
Total de Identificados									80,07

TR: Tempo de Retenção, IR: Índice de Retenção, AP: Área Proporcional, N.I.: Não Identificado.

6.2. EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cyperus articulatus* NA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

A citotoxicidade correspondente ao tratamento por 72 horas com diferentes concentrações do óleo essencial do rizoma de *C. articulatus* em diferentes linhagens celulares neoplásicas está apresentada na Tabela 4. O uso do óleo essencial resultou em valores de CI_{50} que variaram de 28,5 $\mu\text{g/mL}$, para a linhagem HepG2, a uma concentração superior ao limite máximo mensurado pelo teste de citotoxicidade por alamar blue, de $>50 \mu\text{g/mL}$, na linhagem HCT116.

A doxorrubicina apresentou valores de CI_{50} variando de 0,03 a 0,3 $\mu\text{g/mL}$, nas linhagens HepG2 e MCF-7, respectivamente. Estas mesmas linhagens, seguindo a mesma ordem, também representaram os extremos de valores de CI_{50} encontrados após o tratamento com 5-fluorouracil, a saber 0,2 $\mu\text{g/mL}$, para as células HepG2, e 1,8 $\mu\text{g/mL}$, para células MCF-7.

A linhagem MRC-5, foi utilizada para fins comparativos do tratamento em uma linhagem não tumoral. Nesta, os valores de CI_{50} encontrados foram de 46,0 $\mu\text{g/mL}$, 0,2 $\mu\text{g/mL}$ e 7,5 $\mu\text{g/mL}$, para os tratamentos com o OE, DOX e 5-fluorouracil, respectivamente.

Tabela 4. Atividade citotóxica dos tratamentos em diferentes linhagens celulares.

Células	CI_{50} em $\mu\text{g/mL}$		
	Doxorrubicina	5-Fluorouracil	OE <i>C. articulatus</i>
<i>Linhagens Neoplásicas</i>			
B16F10	0,2 0,2 - 0,2	0,5 0,3 - 0,8	39,7 32,1 - 49,0
HCT116	0,1 0,1 - 0,2	0,5 0,3 - 1,1	> 50
HepG2	0,03 0,01 - 0,20	0,2 0,1 - 0,4	28,5 23,8 - 36,4
HL-60	0,04 0,02 - 0,08	1,6 1,2 - 2,2	33,5 27,3 - 41,2
MCF-7	0,3 0,2 - 0,4	1,8 0,7 - 2,3	36,7 26,7 - 50,5
<i>Linhagem Não Neoplásica</i>			
MRC-5	0,2 0,1 - 0,5	7,5 5,2 - 11,0	46,0 39,6 - 53,6

Valores de CI_{50} e respectivos intervalos de confiança de 95% em diferentes linhagens celulares, após ensaio de citotoxicidade de 72h de exposição das diferentes substâncias teste, utilizando o método de alamar blue. Os valores em $\mu\text{g/mL}$ foram obtidos por regressão não linear após três experimentos independentes, realizados em duplicata. Doxorrubicina e 5-fluorouracil foram utilizados como controle positivo.

Como o tratamento com o OE apresentou maior potencial citotóxico na linhagem HepG2, quando comparado aos valores de CI_{50} mensurados nas demais linhagens tumorais e, conseqüentemente, foi responsável pela maior seletividade do tratamento (em comparação à CI_{50} da linhagem não neoplásica), as células do CHC humano foram selecionadas para prosseguir nos experimentos ulteriores. Para tanto, foi estabelecida a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, baseada numa aproximação do valor da CI_{50} determinada na linhagem HepG2, como padrão para os testes. Utilizou-se também concentrações referentes à metade e ao dobro da concentração padrão (12,5 e 50 $\mu\text{g/mL}$), a fim de compreender os mecanismos do tratamento nos períodos que variam entre 24 e 72 horas.

6.3. EFEITO DO TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2

A fim de confirmar os efeitos citotóxicos gerados pelos tratamentos, as células HepG2 foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular por exclusão com azul tripan. Nos períodos de 24, 48 e 72 horas a incubação com o OE resultou em ação citotóxica, reduzindo o número de células viáveis de forma concentração dependente, quando comparadas ao controle negativo DMSO (Figura 1A, 1C e 1E). No menor período de tratamento, os percentuais de inibição gerados foram de 5,3%, 9,9% e 24,1%, respectivos às concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1B). Essas concentrações conduziram, no entanto, à inibição significativa das células tratadas no período de 48 horas, resultando em 37,9% de inibição para a concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 47,9% para 25 $\mu\text{g/mL}$ e 61,4% para 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1D). Em 72 horas, a inibição celular correspondeu aos percentuais de 42,2%, 58,8% e 87,9%, respectivos às concentrações de 12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1F).

O controle positivo, DOX, foi capaz de atuar, significativamente, sob a integridade celular em todos os períodos de tratamento, levando a uma inibição de 43%, 85,5% e 98,8% para os intervalos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

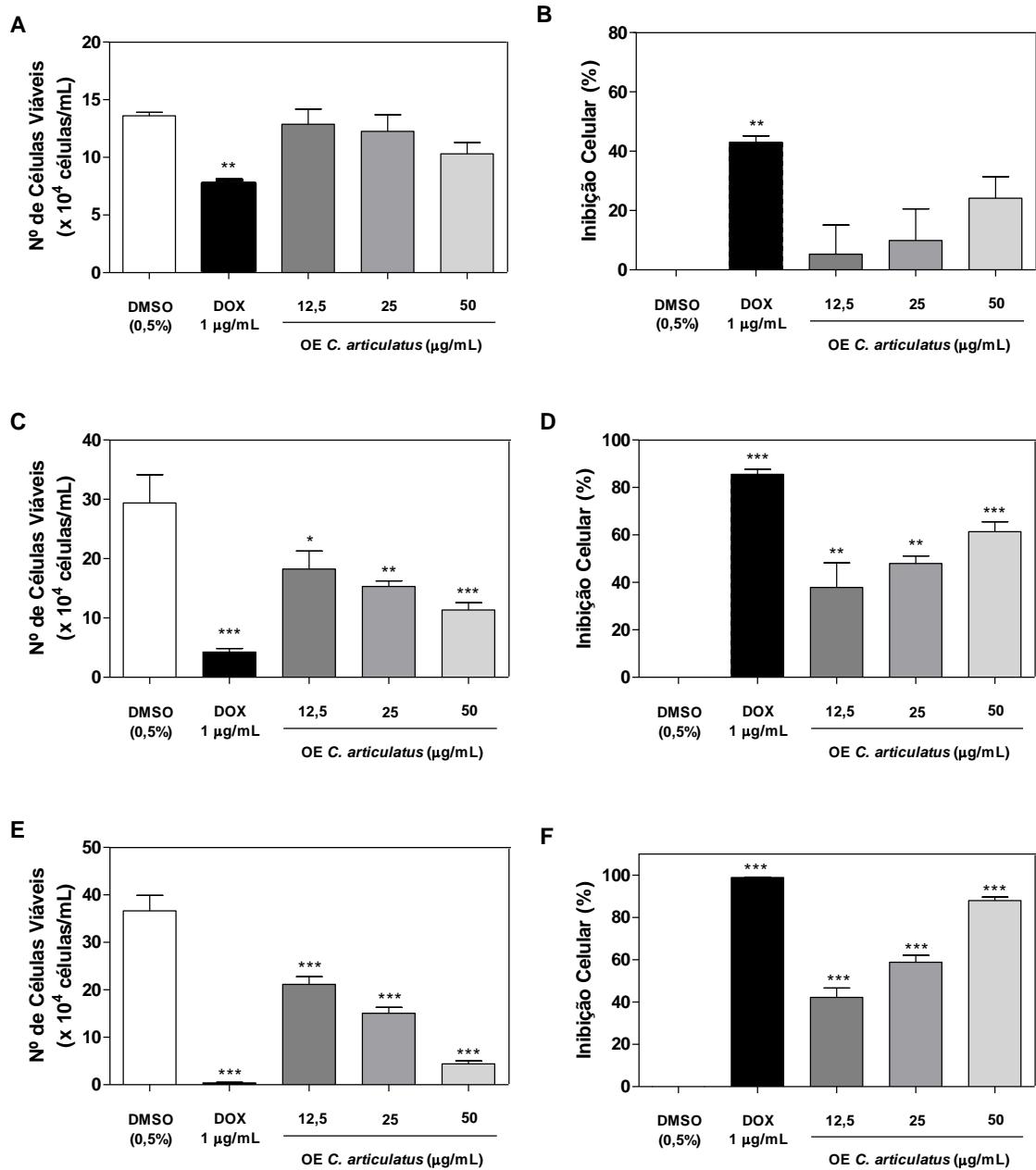


Figura 1. Efeito da utilização do óleo essencial obtido do rizoma de *Cyperus articulatus* na viabilidade de células HepG2, mensurado pelo ensaio de exclusão com azul tripan, após tratamentos por 24, 48 e 72 horas. O impacto dos tratamentos sobre o número de células HepG2 são apresentados para os períodos de 24 (A), 48 horas (C) e 72 horas (E), e como percentual de inibição sobre os mesmos intervalos (B, em 24 horas, D, em 48 horas, e F, em 72 horas). O controle negativo utilizado, DMSO (0,5%), corresponde a maior concentração do diluente para solubilizar as substâncias teste. Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo. As barras e valores apresentados correspondem a média \pm E. P. M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por *One way* ANOVA, seguido pelo pós-teste Newman-Keuls.

6.4. CONSEQUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL NA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HEPG2

A observação qualitativa da morfologia das células após os diferentes tratamentos, seguido por processamento e coloração por panótico rápido, demonstrou a capacidade do OE em produzir diversas alterações estruturais que geram indícios de morte celular (Figura 2).

Enquanto as células tratadas com o DMSO apresentaram estrutura celular preservada ao longo dos diferentes intervalos de tratamento, a utilização da doxorubicina, desde as 24 horas iniciais, resultou em alterações significantes. Foi observado uma diminuição no volume das células, com fragmentação evidente da cromatina, picnose e a formação de vários corpos apoptóticos, com aparente perda da adesão celular.

Essas alterações também foram apresentadas após utilização do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus*, mostrando-se cada vez mais perceptíveis de maneira em que eram aumentados o tempo de exposição e a concentração do óleo utilizado. Na menor concentração do OE foram notadas células em aparente divisão, evidenciando a baixa capacidade do óleo em agir citotóxicamente nesta condição. No entanto, mesmo com esta concentração, eventos iniciais de picnose foram apresentados, se tornando mais comuns nos intervalos de 48 e 72h. Estes eventos se tornaram mais evidentes no tratamento com 25 µg/mL com evolução para estágios de cariorrexe, especialmente no intervalo de 48h. Também foi registrada a formação de projeções nas membranas celulares, seguido da formação de corpos apoptóticos.

Por fim, uma clara modificação na relação núcleo citoplasma das células - que mesmo quando ainda aderidas apresentaram encolhimento do citoplasma e alongamento da morfologia -, foi bem evidenciada nas 72 horas de exposição ao OE, para as menores concentrações. Adicionalmente, a formação de corpos apoptóticos, condensação da cromatina e retração citoplasmática após tratamento com a concentração de 50 µg/mL foi notada, ressaltando a capacidade do tratamento em alterar as características morfológicas comuns às células HepG2, destacadas no grupo controle.

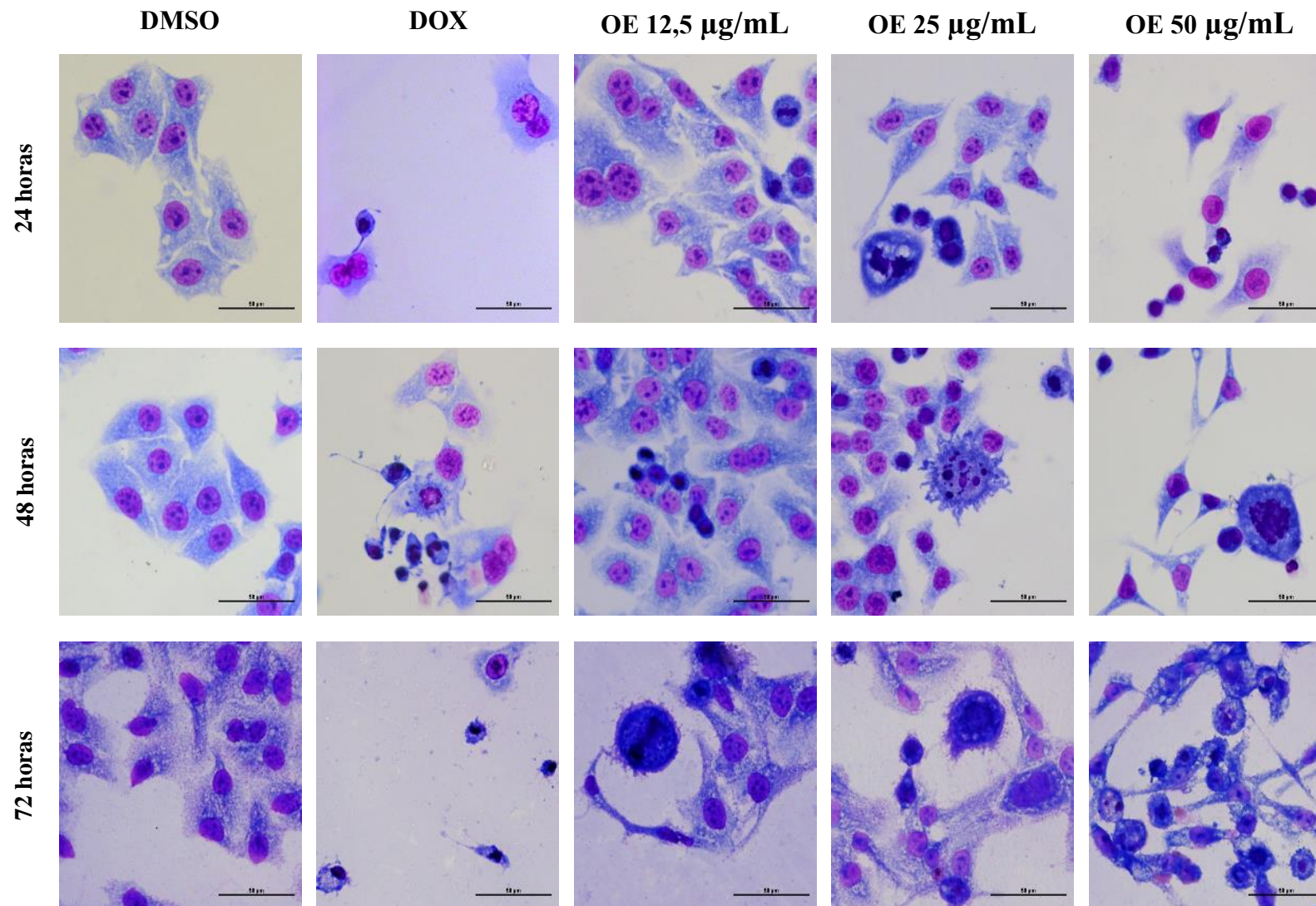


Figura 2. Micrografias ópticas de células HepG2 após tratamento com o óleo essencial do rizoma de *C. articulatus* e coradas por panótico rápido. Os regimes de tratamento com OE se deram com 12,5, 25 e 50 µg/mL em períodos de 24, 48 e 72 horas. Dimetilsulfóxido (DMSO, 0,5%) foi utilizado como controle negativo e doxorrubicina (DOX, 1 µg/mL) como controle positivo. O experimento foi realizado em duplicata. Barras representam 50 µm.

6.5. IMPACTO DO TRATAMENTO COM ÓLEO ESSENCIAL SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS HEPG2

A distribuição do ciclo celular nas células HepG2 após 24 e 48 horas de incubação com os diferentes tratamentos foi mensurada por citometria de fluxo. Entende-se que a quantidade do material genético sofre variações nas diferentes etapas do ciclo, atribuindo-se a característica de fragmentado ao material correspondente a sub-G₀/G₁. A Tabela 5 apresenta os percentuais do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular e a Figura 3 os histogramas representativos obtidos por citometria de fluxo.

Tabela 5. Efeito do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus* na distribuição do conteúdo de DNA de células HepG2.

Tratamento	Concentração (µg/mL)	Distribuição do Conteúdo de DNA (%)			
		Sub G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24 horas					
DMSO 0,5%	-	5,2 ± 0,2	52,1 ± 1,3	15,6 ± 1,2	16,1 ± 1,2
Doxorrubicina	1	4,5 ± 0,9	37,6 ± 2,1 *	17,6 ± 1,4	27,3 ± 1,6 *
OE <i>C. articulatus</i>	12,5	5,1 ± 0,4	52,1 ± 0,8	10,7 ± 2,4	21,3 ± 3,1
	25,0	6,81 ± 0,8	55,4 ± 1,2	13,1 ± 1,3	20,3 ± 1,4
	50,0	10,6 ± 2,4 *	48,9 ± 1,6	11,3 ± 0,8	24,7 ± 1,6 *
48 horas					
DMSO 0,5%	-	5,7 ± 1,5	57,1 ± 3,0	12,1 ± 0,4	17,5 ± 0,6
Doxorrubicina	1	22,4 ± 3,5 *	40,2 ± 6,7 *	8,4 ± 0,3 *	7,8 ± 0,7 *
OE <i>C. articulatus</i>	12,5	11,3 ± 1,5	55,2 ± 1,6	13,1 ± 1,2	14,8 ± 0,8 *
	25,0	9,2 ± 1,5	55,4 ± 4,1	11,0 ± 0,8	14,4 ± 0,7 *
	50,0	17,7 ± 3,0 *	55,8 ± 3,4	6,0 ± 0,9 *	12,5 ± 0,8 *

A tabela apresenta os valores correspondentes a média ± E. P. M. de três experimentos independentes realizados em duplicata para cada condição temporal. DMSO (dilúente das substâncias) e doxorrubicina foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram contabilizados por amostra, utilizando-se da citometria de fluxo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por *One way* ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls.

Nas primeiras 24 horas de tratamento, o OE levou ao aumento do conteúdo de DNA na fase G₂/M do ciclo celular, quando comparado ao controle DMSO. Nesta fase observou-se a marcação de 21,3%, 20,3% e 24,7% das células sob a ação de 12,5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL do OE, respectivamente. Notou-se também um aumento significativo no conteúdo de células na fração sub-G₀/G₁ após o tratamento com 50 µg/mL (10,6% versus 5,2%, do controle

negativo). No período de 48 horas, no entanto, houve uma significativa redução no percentual de células na fase G₂/M e um aumento nas células marcadas na fração sub-G₀/G₁. Foram quantificadas 11,3% (12 µg/mL), 9,2% (25 µg/mL) e 17,7% (50 µg/mL) de células marcadas nesta fração.

A DOX seguiu o mesmo padrão de distribuição apresentado com o uso do óleo essencial. Em 24 horas, houve aumento significativo das células na fase G₂/M do ciclo celular, apresentando um percentual de 27,3, e 22,4% de células foram acumuladas na fração sub-G₀/G₁, após 48 horas de tratamento.

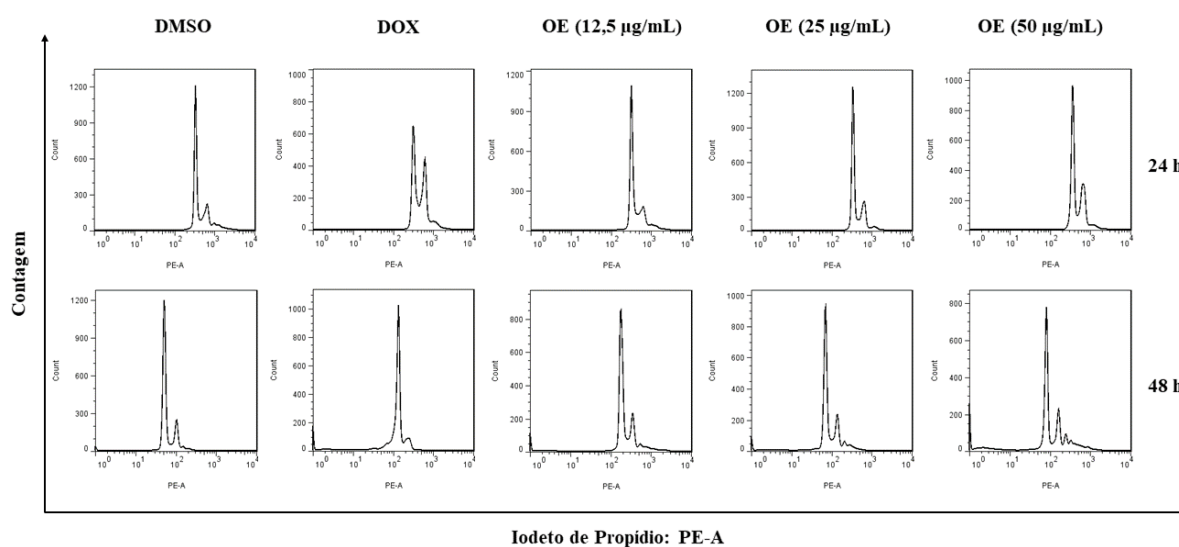


Figura 3. Histogramas representativos da análise de distribuição do conteúdo de DNA no ciclo celular de células HepG2 após tratamento com óleo essencial (OE) do rizoma de *Cyperus articulatus*. O controle negativo utilizado, DMSO (0,5%), corresponde à maior concentração do diluente para solubilizar as substâncias teste. Doxorrubicina (DOX, 1 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram contabilizados por amostra e os detritos celulares foram omitidos das análises.

6.6. EFEITO DOS TRATAMENTOS NO PERFIL DE MORTE CELULAR

Com o uso das sondas anexina V-FITC e iodeto de propídio e conseqüente quantificação, por citometria de fluxo, da externalização da fosfatidilserina e permeabilidade da membrana plasmática, realizou-se a inferência do perfil de morte celular associado aos diferentes tratamentos em teste. A Figura 4 resume o percentual de células HepG2 para cada condição analisada, a saber células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia e células necróticas, e a Figura 5 apresenta os *dotplots* representativos para cada condição.

O uso do OE não foi capaz de gerar uma diminuição significativa no percentual de células viáveis nas primeiras 24 horas de tratamento para as menores concentrações testadas. No entanto, para a concentração de 50 µg/mL, houve uma redução significativa de 14,6% na viabilidade das células em relação ao controle DMSO (0,5%), culminando em um aumento significativo no percentual de células com externalização da fosfatidilserina (6,6% de células em apoptose inicial; 13,8% de células em apoptose tardia). O acúmulo de células em apoptose também ocorreu de forma significativa para o tratamento com 25 µg/mL do OE; dividiu-se em 3,25% de células em apoptose inicial e 6,95% das células em apoptose tardia.

Por sua vez, nos tratamentos em 48h foi observado um aumento concentração dependente no percentual de células com fosfatidilserina marcada. Nesta condição, 9,4% das células apresentaram-se em apoptose inicial, para a concentração de 25 µg/mL. Para o tratamento com 50 µg/mL, 14,2% e 10,7% de células apresentaram marcação para os eventos de apoptose inicial e tardia, respectivamente. Esse aumento significativo no percentual de células marcadas com a sonda anexina V-FITC sugere a propensão para uma morte apoptótica após a exposição das células HepG2 ao OE do rizoma da *C. articulatus*.

A utilização da DOX culminou em aumento significativo da morte celular, com favorecimento da via necrótica. Em 24 horas, 23,6% de células marcadas com anexina V-FITC foram evidenciadas como em apoptose tardia e 73,4% apresentaram marcação para o iodeto de propídio. Similarmente, após 48 horas de tratamento 19,3% das células apresentaram perfil apoptótico tardio e 66,3% necrótico.

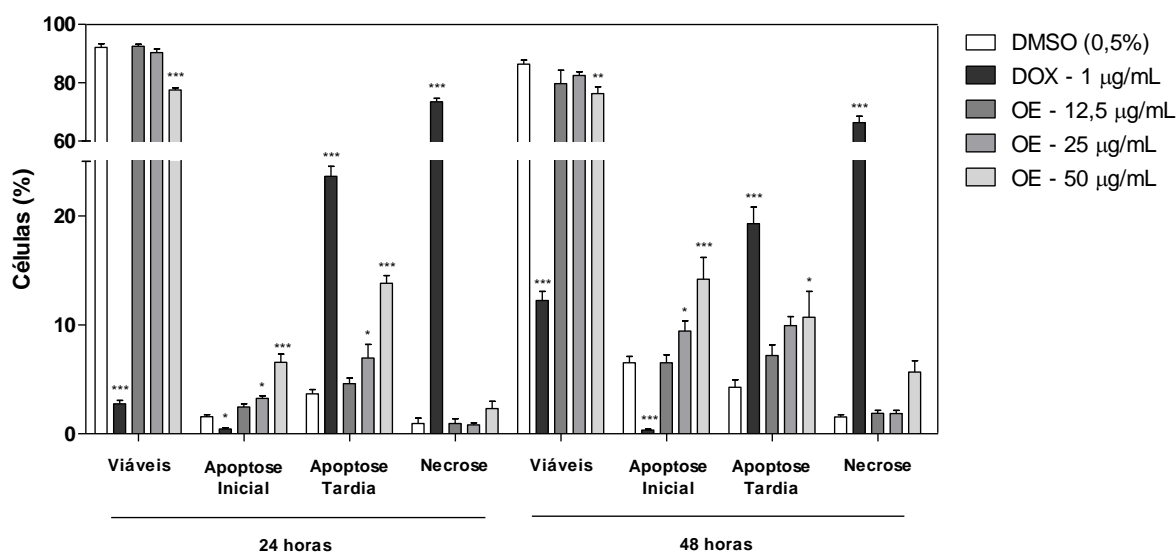


Figura 4. Efeito do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus* sobre a viabilidade de células HepG2, determinado por citometria de fluxo, usando anexina V-FITC/iodeto de

propídio, após 24 e 48 h de incubação. DMSO (diluinte das substâncias) e doxorrubicina foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram contabilizados por amostra. As barras correspondem a média \pm E. P. M. de três experimentos independentes realizados em duplicata para cada condição temporal. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por *One way ANOVA*, seguido pelo pós-teste Newman-Keuls.

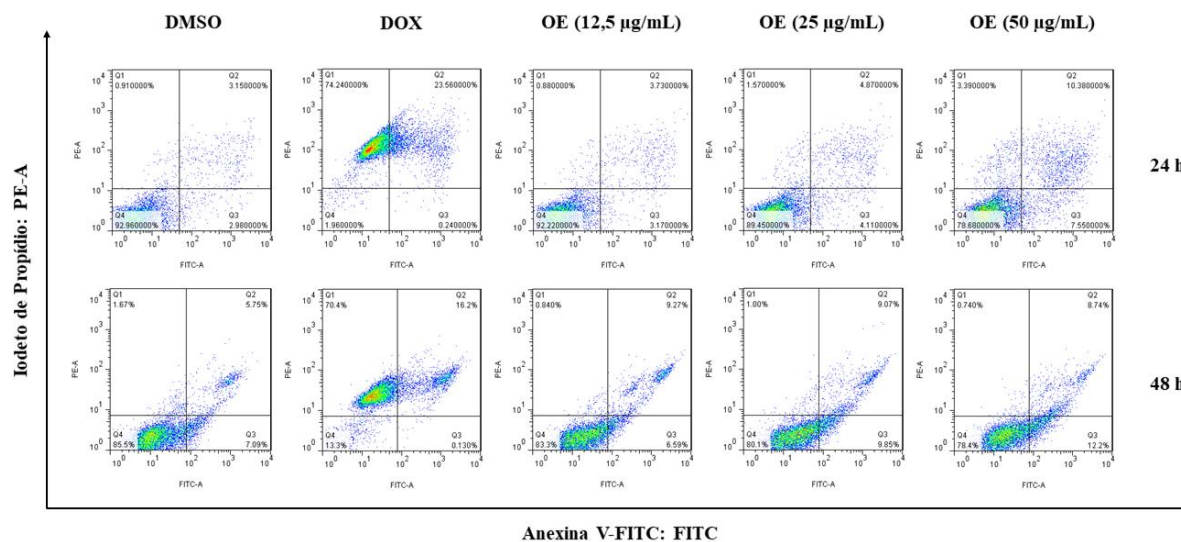


Figura 5. Dotplots representativos do efeito do óleo essencial (OE) do rizoma de *Cyperus articulatus* no perfil de morte celular das células HepG2 após tratamento. O controle negativo utilizado, DMSO (0,5%), corresponde a maior concentração do diluinte para solubilizar as substâncias teste. Doxorrubicina (DOX, 1 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Dez mil eventos foram contabilizados por amostra e os detritos celulares foram omitidos das análises.

6.7. EFEITO DA EFICÁCIA ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DO RIZOMA DE *C. articulatus*

A atividade antitumoral do óleo essencial foi testada em modelo de xenotransplante heterotópico de células HepG2, em camundongos C.B-17 SCID. O ensaio ocorreu por injeção intraperitoneal da solução de OE, nas doses de 40 e 80 mg/kg, em regime diário, por 21 dias. No 22º dia, a massa tumoral média do grupo DMSO foi de $0,51 \pm 0,05$ g, enquanto o controle positivo, 5-fluorouracil, apresentou valor médio de $0,30 \pm 0,04$ g (Figura 6A). O uso do OE do rizoma de *C. articulatus* resultou em massa tumoral média de $0,27 \pm 0,05$ g e $0,25 \pm 0,02$ g, para as respectivas doses de 40 e 80 mg/kg. Todos os regimes de tratamento promoveram uma inibição significativa dos tumores, quando comparados ao controle negativo (Figura 6B). Os percentuais de redução foram de 40,1, para o 5-fluorouracil, 46,5, em resposta ao OE na dose de 40 mg/kg, e 50,0 para o OE na sua maior dose, 80 mg/kg.

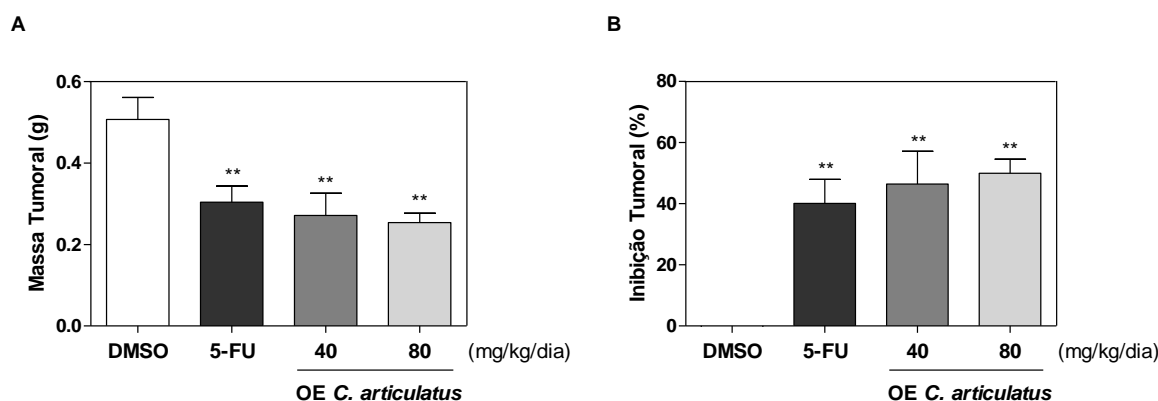


Figura 6. Efeito antitumoral do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus* em camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2. Mensuração da massa dos tumores (A) e inibição tumoral (B). DMSO 5%, utilizado como diluente das substâncias, representa o controle negativo. 5-Fluorouracil (5-FU 10 mg/kg), representa o controle positivo. Barras correspondem a média \pm E.P.M. da massa (g) ou da inibição tumoral (%) de 10 animais. ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle negativo por *One way ANOVA*, seguido pelo pós-teste Newman-Keuls.

6.7.1. Efeito do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus* na toxicidade sistêmica de camundongos inoculados com células HepG2

O efeito tóxico sistêmico dos tratamentos com o OE foi avaliado ao decorrer do ensaio *in vivo*, conforme expresso na Tabela 6. Durante os 21 dias de tratamento os camundongos C.B-17 SCID não apresentaram sinais físicos observáveis associados à toxicidade do tratamento; também, não ocorreram óbitos durante o ensaio.

Nenhuma diferença significativa, quando comparada ao grupo controle DMSO, foi encontrada para a massa corpórea inicial e final dos animais. Da mesma forma, nos grupos teste não houve alterações significativas na massa relativa dos órgãos coletados.

A Tabela 7 resume os achados relativos aos parâmetros hematológicos encontrados nos diferentes grupos. Os valores mensurados para eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, plaquetas, leucócitos totais e contagem diferencial de leucócitos não sofreram alterações significantes quando comparadas ao controle negativo.

Tabela 6. Efeito do óleo essencial de *Cyperus articulatus* na sobrevida, massa corpórea e massa relativa dos órgãos de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.

Grupos	Dose (mg/kg)	Sobrevida	Coração (g/100 g de massa corpórea)	Fígado (g/100 g de massa corpórea)	Pulmão (g/100 g de massa corpórea)	Rins (g/100 g de massa corpórea)	Massa Corpórea Inicial (g)	Massa Corpórea Final (g)
DMSO (5%)	-	10/10	0,5 ± 0,1	4,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1	21,4 ± 0,5	22,1 ± 0,5
5-Fluorouracil	10	10/10	0,6 ± 0,1	4,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1	19,6 ± 0,6	20,5 ± 0,5
Óleo Essencial <i>C. articulatus</i>	40	10/10	0,6 ± 0,1	5,4 ± 0,3	0,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	21,0 ± 0,4	19,8 ± 0,9
	80	10/10	0,6 ± 0,1	4,9 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,1	21,0 ± 0,5	21,9 ± 0,5

Os valores correspondem a média ± E.P.M. da massa. O controle negativo, DMSO (5%), foi utilizado como diluente das substâncias. 5-fluorouracil representa o controle positivo.

Tabela 7. Efeito do óleo essencial de *Cyperus articulatus* nos parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos C.B-17 SCID inoculados com células HepG2.

Grupos	Dose (mg/kg)	Eritrócitos (10 ³ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	Leucócitos (10 ⁶ cél/μL)	Contagem Diferencial de Leucócitos (%)		
								Granulócitos	Linfócitos	Monócitos
DMSO (5%)	-	5,2 ± 1,1	21,2 ± 4,8	26,7 ± 4,4	43,8 ± 0,4	247,2 ± 38,5	5,2 ± 0,8	24,1	41,5	33,6
5-Fluorouracil	10	7,6 ± 0,8	17,7 ± 3,1	39,4 ± 0,4	45,0 ± 3,0	222,1 ± 41,6	2,5 ± 0,6	28,4	46,1	25,5
Óleo Essencial <i>C. articulatus</i>	40	5,4 ± 1,1	26,8 ± 0,7	8,6 ± 0,2	41,5 ± 0,5	456,7 ± 112,2	7,6 ± 0,7	25,7	52,2	21,2
	80	6,7 ± 1,3	18,0 ± 1,4	41,5 ± 0,5	44,8 ± 0,5	464,1 ± 62,4	2,9 ± 0,7	34,3	40,4	25,3

Os valores correspondem a média ± E.P.M. O controle negativo, DMSO (5%), foi utilizado como diluente das substâncias. 5-fluorouracil representa o controle positivo. * P<0,05 quando comparado ao grupo controle negativo por *One way* ANOVA, seguido pelo pós-teste Newman-Keuls. VCM: Volume Corpuscular Médio.

6.7.2. *Análise histopatológica dos tumores HepG2 após o tratamento com o óleo essencial do rizoma de C. articulatus*

A Figura 7 esquematiza os achados histopatológicos para as seções tumorais dos diferentes tratamentos. Em todos os grupos, observou-se um carcinoma organizado em múltiplos nódulos hipovascularizados, delimitados por cápsula fibrosa, compostos por células pleomórficas, altamente malignas e hipercromáticas. Nestes as células tumorais dividiam-se ativamente com a área necrótica visível, apesar da menor frequência de mitoses no grupo OE de dosagem 80 mg/kg, nas seções analisadas. Degeneração e necrose foram aspectos observados em todos os grupos, mas em menor grau nos grupos controle negativo e OE 40 mg/kg.

6.7.3. *Análise histopatológica dos órgãos coletados após o tratamento com o óleo essencial do rizoma de C. articulatus*

A Figura 8 ilustra os achados histopatológicos para os órgãos coletados. Nos pulmões, a arquitetura do parênquima foi parcialmente mantida em todos os grupos, observando-se um espessamento do septo alveolar com diminuição do espaço aéreo, variando de leve a moderado, em todos os grupos experimentais. Congestão e hemorragia foram frequentemente observadas, variando de leve a grave, em todos os tratamentos.

A arquitetura hepática e portal foi preservada na maioria dos fígados, exceto nos animais do grupo controle positivo (5-fluorouracil), que apresentaram áreas focais de necrose de coagulação. As alterações histopatológicas observadas foram congestão vascular, degeneração hidrópica e inflamação focal, predominantemente mononuclear, na região portal, variando de leve a moderada.

Nos rins, a arquitetura tecidual foi mantida. No entanto, foram observadas alterações histopatológicas em todos os grupos experimentais, como congestão vascular moderada e espessamento da membrana basal dos glomérulos renais, variando de leve a moderado, culminando em diminuição do espaço urinário.

Não foram observadas alterações nas seções do coração.

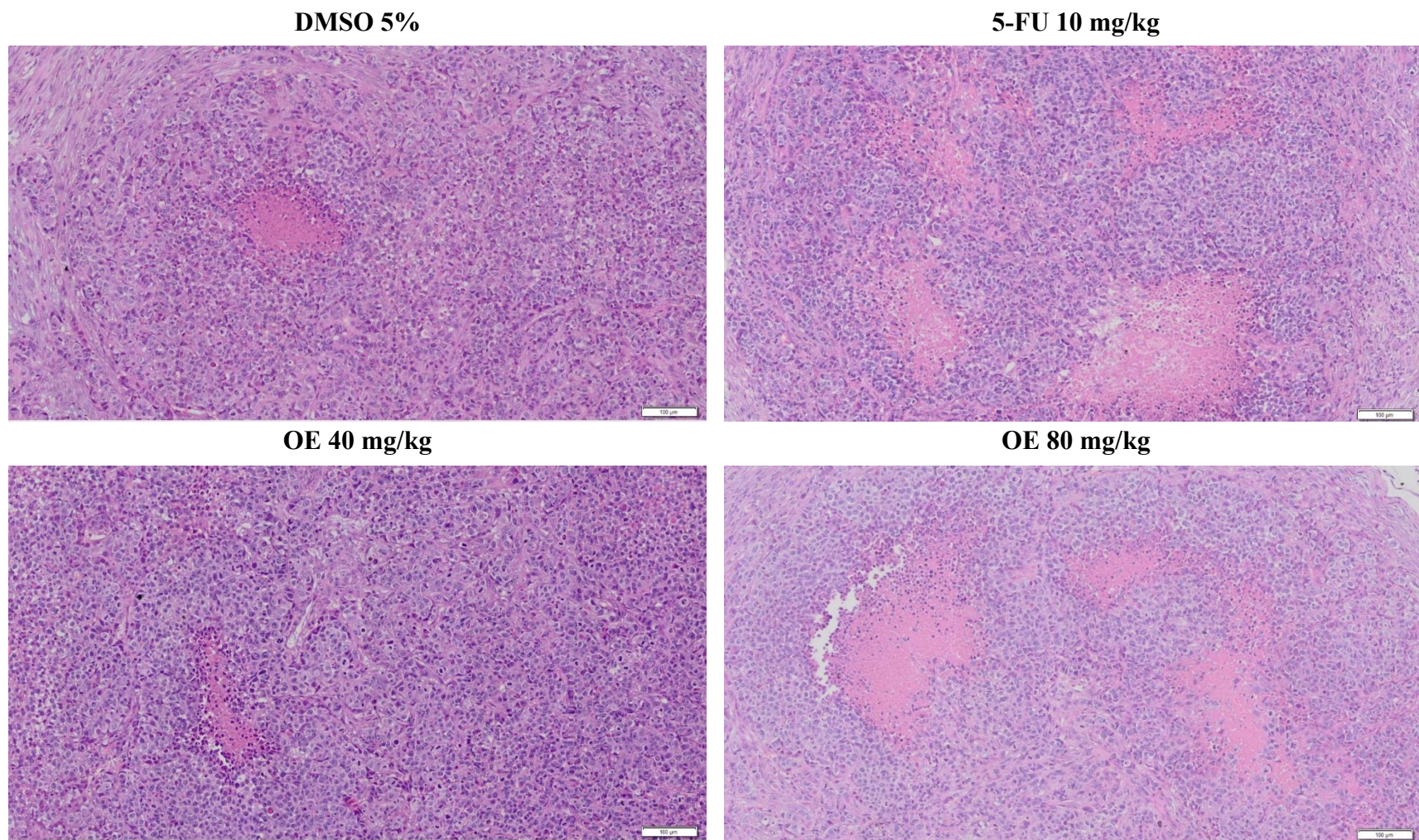


Figura 7. Fotomicrografias representativas dos tumores HepG2 tratados com óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus*. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO, 5%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes; 5-fluorouracil (5-FU, a 10 mg/kg) foi utilizado como controle positivo. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e analisados através da microscopia óptica. Após implantação das células tumorais, os animais foram tratados por via intraperitoneal durante 21 dias consecutivos com os compostos-teste. OE: Óleo Essencial. Barras representam 100 µm.

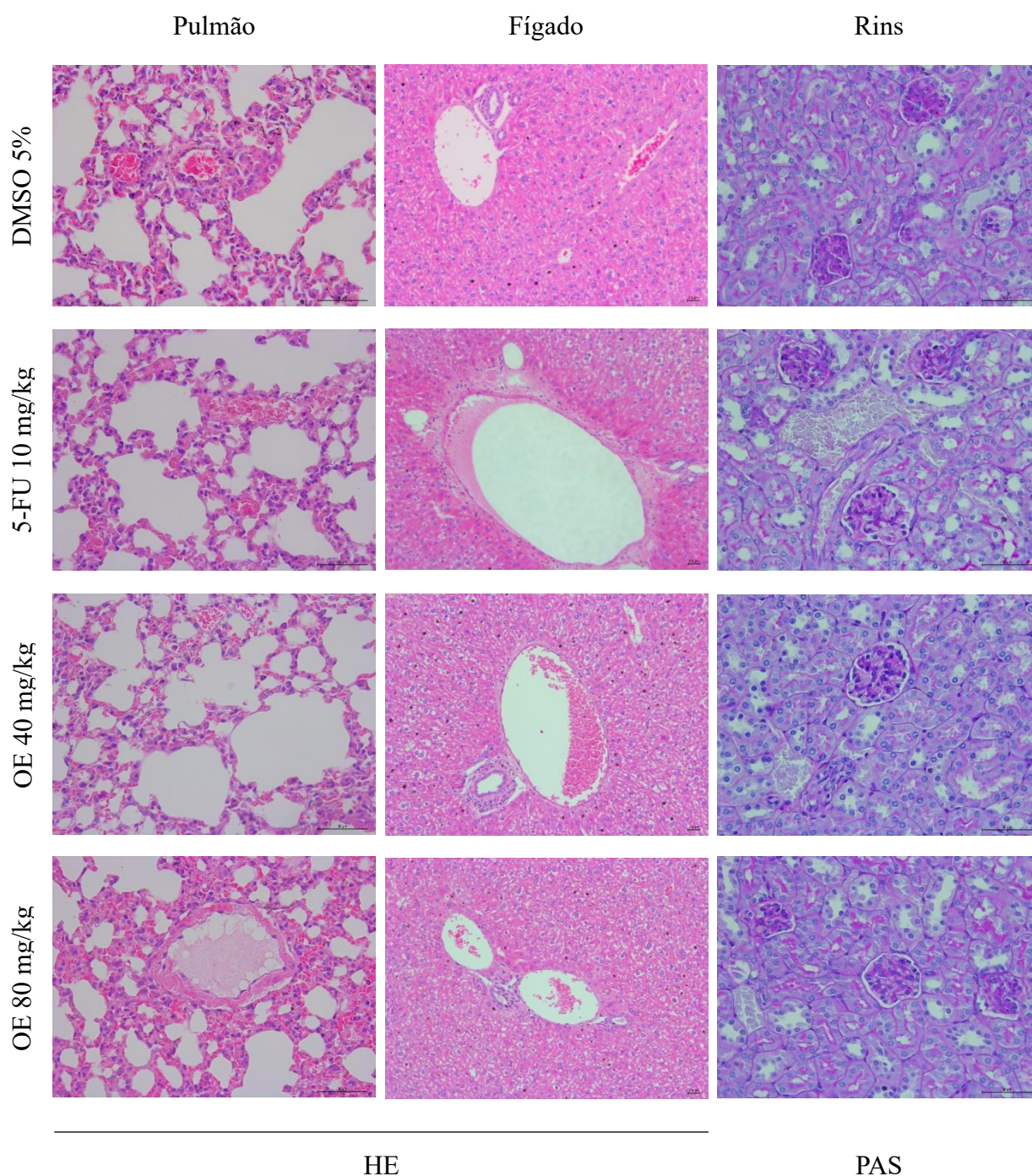


Figura 8. Fotomicrografias representativas dos órgãos dos animais tratados com o óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus*. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO, a 5%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes; 5-fluorouracil (10 mg/kg) foi utilizado como controle positivo. Os cortes histológicos de fígado e pulmão foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e os rins foram corados pelo ácido periódico-Schiff (PAS). OE: Óleo essencial. Barras representam 100 μ m.

7. DISCUSSÃO

Apesar do papel fundamental das pesquisas oncológicas em indicar os fatores de risco e desvendar alguns dos mecanismos genéticos e moleculares acerca da patogênese do carcinoma hepatocelular, esta neoplasia continua a se expandir em todo o mundo, caracterizando-se como o mais predominante tipo de câncer do fígado e uma das mais expressivas neoplasias em número de mortes (OMS, 2019b; GHOURI; MIAN; ROWE, 2017). Parte deste quadro é consequência do intrincado, porém silencioso, desenvolvimento da doença, que culmina na maioria dos casos em um diagnóstico tardio (JIN et al., 2019). Neste cenário, as opções terapêuticas são reduzidas, baseando-se essencialmente na quimioterapia paliativa, com efeitos adversos associados e resistência reportada (ZHU et al., 2017; MÉNDEZ-BLANCO et al., 2018). Desta forma, é imprescindível a busca por novas estratégias de tratamento.

Dentre as opções exploradas para o desenvolvimento de novos quimioterápicos, o aproveitamento da diversidade e complexidade das substâncias derivadas de produtos naturais tem despertado um grande interesse científico, e hoje já corresponde a uma importante parcela dos quimioterápicos antineoplásicos (KURUPPU; PARANAGAMA; GOONASEKARA, 2019; CRAGG; NEWMAN, 2005). Baseado nesta tendência e nos relatos da literatura acerca do emprego de óleos essenciais e das propriedades farmacológicas da *C. articulatus*, neste estudo avaliamos o potencial citotóxico do óleo essencial do rizoma da referida planta em diferentes linhagens celulares neoplásicas e, pela primeira vez, exploramos alguns dos possíveis mecanismos de ação envolvidos no seu uso, demonstrando sua capacidade citotóxica frente a algumas linhagens tumorais.

Os ensaios de citotoxicidade são parte essencial do processo de desenvolvimento de novos fármacos por oferecerem, de forma rápida, informações vitais que compõem a plataforma inicial na busca por novas terapias em câncer (MÉRY et al., 2017; EDIRIWEERA; TENNEKOON; SAMARAKOON, 2019). Neste sentido, evidências mostram a ação citotóxica de algumas espécies do gênero *Cyperus* em linhagens de células neoplásicas. Kilani e colaboradores (2008) reportaram a ação antineoplásica do OE de tubérculos de *C. rotundus* sobre células L1210 (leucemia linfocítica murina), apresentando CI_{50} de 49 $\mu\text{g/mL}$, após 48 horas de tratamento. Atividade similar foi expressa com o uso do óleo derivado da mesma região anatômica da planta sobre a linhagem HeLa (carcinoma cervical) (CI_{50} 35,06 $\mu\text{g/mL}$), após 24h de incubação (SUSIANTI et al., 2018).

Por sua vez, as linhagens HT29 (adenocarcinoma colorretal), HCT116 (carcinoma colorretal), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo-negativo) foram submetidas ao OE do rizoma de *C. rotundus* e resultaram nas respectivas CI_{50} de 28,8, 21,3, 41,2 e 44,3 $\mu\text{g/mL}$, após 72 horas de tratamento (YAGI et al., 2016). Utilizando o OE de *C. lungus*, o grupo de Memariani (2016) determinou CI_{50} de 31,35 $\mu\text{g/mL}$ em células MCF-7 e 39,91 $\mu\text{g/mL}$ em células PC-3 (adenocarcinoma de próstata).

Esses dados são consistentes com as CI_{50} mensuradas em nosso painel de células, onde os valores determinados também estiveram acima dos 20 $\mu\text{g/mL}$ para todas as linhagens; variando de 28,5 $\mu\text{g/mL}$, na linhagem HepG2, a > 50 $\mu\text{g/mL}$, na linhagem HCT116. No entanto, de acordo com o programa de triagem do nosso grupo de pesquisa, e seguindo as determinações pré-estabelecidas pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, óleos essenciais com CI_{50} abaixo de 30 $\mu\text{g/mL}$ são considerados promissores e podem ser selecionados para estudos de mecanismo (COSTA et al., 2020; SILVA et al., 2016; SUDHA; MASILAMANI, 2012; SUFFNESS, 1990). Desta forma, o uso do OE foi considerado promissor quando aplicado em células HepG2.

O potencial citotóxico do OE de *C. articulatus* foi confirmado pelo ensaio de integridade com azul tripan, que mensura a continuidade da membrana plasmática. Nossos dados mostraram uma relação tempo e concentração dependente na atuação do óleo, culminando em inibição significativa das células HepG2 a partir de 48 horas. Este achado é corroborado pela ação demonstrada pelo OE da planta em células MDA-MB-231, onde tanto a utilização do óleo livre quanto encapsulado em nanopartículas culminou na diminuição da viabilidade destas células após 48 horas de incubação (KAVAZ; IDRIS; ONYEBUCHI, 2019).

Essa atuação citotóxica frente a células neoplásicas pode ser compreendida pela complexa composição química apresentada no óleo teste. As análises quali-quantitativas revelaram a composição dominada por terpenóides, especialmente sesquiterpenos oxigenados e monoterpenos hidrocarbonetos, predominantes em óleos essenciais da família Cyperaceae (ZOGHBI et al., 2006; KAVAZ; IDRIS; ONYEBUCHI, 2019). Os terpenóides são metabólitos secundários de plantas e alguns microrganismos, como bactérias e leveduras, e se apresentam como um rico reservatório de compostos para novas terapias em carcinomas como os da mama, pele, pulmão, cólon, pâncreas e próstata (HUANG et al., 2012). No câncer hepático diversos grupos de pesquisa estão explorando as propriedades terapêuticas e quimiopreventivas dos terpenóides em estudos *in vitro* e *in vivo* (THOPPIL; BISHAYEE, 2011).

As substâncias mais representativas encontradas na amostra do OE de *C. articulatus* foram muscatona, ciclocolorenona, α -pineno, pogostol, α -copaeno e óxido de cariofileno.

Todas estas também representaram contituíndes expressivos no OE do rizoma de *C. articulatus* coletados no Brasil (SILVA et al., 2019; BERSAN et al., 2014; ZOGHBI et al., 2006). No entanto, OE obtidos de plantas da mesma espécie em países africanos, como Camarões e Nigéria, apresentaram muitas substâncias majoritárias diferentes, embora ainda no grupo dos monoterpenos e sesquiterpenos, como β -pineno, trans-pinocarveol, verbeol, cariofileno, γ -patchuleno, cedrol e cadinol. (METUGE et al., 2014b; HASSANEIN et al., 2014; KAVAZ; IDRIS; ONYEBUCHI, 2019). Essa disparidade exemplifica a variabilidade na composição dos OE dentro de uma mesma espécie, o que pode ser resultado da localização geográfica, condições do solo, estágio de desenvolvimento da planta, sazonalidade, luminosidade, disponibilidade de água, temperatura e outros fatores ambientais que podem alterar a composição química dos OE (LOŽIENĖ; VENSKUTONIS, 2005; SILVA et al., 2019).

Dentre as substâncias identificadas, α -copaeno, α -pineno e óxido de cariofileno já foram previamente reconhecidos por suas atividades antitumorais. Turkez e colaboradores (2014) demonstraram o efeito citotóxico do α -copaeno sobre células N2a-NB (neuroblastoma murino) através do aumento do status oxidativo total, após tratamento em altas concentrações com este sesquiterpeno. A ação do α -pineno, por sua vez, foi investigada em modelo de xenotransplante de câncer de próstata, onde tumores formados por células PC-3 foram significativamente inibidos com o tratamento, apresentando eventos de apoptose e parada do ciclo celular (ZHAO et al., 2018). Adicionalmente, esferóides de MDA-MB-231 apresentaram diminuição da invasividade após tratamento com este monoterpeno hidrocarboneto (KANG et al., 2016). Nos carcinomas hepáticos, α -pineno provou-se citotóxico frente a células BEL-7402 (hepatoma celular), promovendo parada do ciclo celular em G₂/M (CHEN et al., 2014; CHEN et al., 2015). E, similarmente, células HepG2 foram inibidas por parada do ciclo, indução de apoptose e promoção do estresse oxidativo (XU et al., 2018).

A investigação da atuação do óxido de cariofileno como agente antiproliferativo e citotóxico é bem disseminada para diversas linhagens celulares *in vitro*, e alguns estudos em modelo animal (FIDYT et al., 2016). Estes estudos apontam a atuação deste sesquiterpeno como indutor apoptótico através da interferência em muitas vias importantes para o processo tumorigênico (PARK et al., 2011; PAN et al., 2016). De interesse especial é a capacidades do óxido de cariofileno em aumentar a eficácia de vários quimioterápicos clássicos, como a doxorubicina e paclitaxel, por inibir a atuação de bombas de efluxo de drogas, especialmente proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) (FIDYT et al., 2016). Essa atuação vem sendo estudada no carcinoma hepatocelular e, comprovadamente, foi capaz de quimiossensibilizar células hepáticas e favorecer a acumulação intracelular do sorafenib (DI GIACOMO et al., 2019).

Desta forma, as capacidades citotóxicas exibidas pelo OE do rizoma de *C. articulatus* podem ser em parte atribuídas a alguns dos seus constituintes majoritários. No entanto, a complexidade do OE deve ser levada em conta, e dificilmente não haverá participação dos componentes minoritários. Na realidade, estes componentes podem contribuir para a citotoxicidade, por agir em sinergia com as substâncias dominantes (KILANI et al., 2008; YAGI et al., 2016).

No contexto do desenvolvimento de antineoplásicos, tão importante quanto causar a morte de células tumorais é entender como determinada substância conduz às células a este desfecho. De fato, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na atuação de uma substância tornam a sua utilização mais segura, ao passo que permitem o entendimento dos seus alvos celulares, a possível necessidade de ativação, a identificação de pacientes mais propensos a responder ao tratamento, a escolha da dosagem, o rastreamento e monitoramento de efeitos colaterais, além de permitir o desenho de novas drogas com efeitos similares, ou ainda a combinação com outras substâncias que atuem em mecanismos adjacentes e complementares (EHRENSTEIN; MAURI, 2007; RATAIN; PLUNKETT, 2003).

A análise morfológica das células HepG2 demonstrou que a capacidade citotóxica do óleo essencial está atrelada a alterações importantes como a diminuição da razão núcleo citoplasma, condensação da cromatina seguida de rompimento nuclear, desprendimento das células do substrato, formação de projeções membranares e separação do conteúdo celular em pequenas unidades delimitadas pela membrana plasmática. Estas alterações morfológicas foram frequentemente observadas em diferentes linhagens neoplásicas após tratamento com extratos de *Cyperus rotundos*, bem como por fitocompostos de outras espécies (LIN et al., 2019; KNTAYYA et al., 2018; MANNARREDDY et al., 2017; KHAZAEI et al., 2017; PARK et al., 2014). Classicamente esses eventos são descritos como marcadores morfológicos da apoptose, sugerindo que este é o mecanismo deflagrado para que o óleo essencial exerça sua ação sobre as células HepG2 (WONG, 2011; SARASTE; PULKKI, 2000).

O ciclo celular é o processo pelo qual as células eucarióticas duplicam o seu conteúdo e se dividem, gerando novas células. Nestes organismos é imprescindível haver uma fina regulação deste processo, a fim de impedir a perpetuação de erros nas progênes celulares, que podem desencadear a carcinogênese. Por isso, o desenvolvimento de drogas que atuem especificamente no ciclo de células neoplásicas é uma estratégia para desregulação e eliminação destas (STEWART; WESTFALL; PIETENPOL, 2003).

Em nosso estudo, o OE de *C. articulatus* culminou na acumulação de células HepG2 na fase G₂/M, de forma concentração dependente, após 24 horas de tratamento. Na mesma

linhagem celular, o uso do α -pineno, um dos mais expressivos componentes do óleo teste, levou à parada das células nessa fase do ciclo após 24 horas (XU et al., 2018). No entanto, a quantidade de células nesta etapa decresceu após 48 horas de tratamento com o OE, observando-se um aumento de células em sub-G₀/G₁ - um indicador de fragmentação do DNA, por vezes associado à morte (KAJSTURA et al., 2007). O acúmulo de células em sub-G₀/G₁ também foi percebido após incubação de células PC-3 e MCF-7 com OE de *C. longus* por 48 horas (MEMARIANI et al., 2016).

Este padrão de distribuição do conteúdo celular parece estar em conformidade com o padrão de ação do OE, observado no ensaio de viabilidade. Neste ensaio, as células não apresentaram inibição significativa em 24 horas. Em 48 horas, no entanto, a diminuição da viabilidade vai ao encontro do acúmulo de células em sub-G₀/G₁ registrado.

Consoante a isto, a fragmentação do DNA é uma das características marcadoras da morte apoptótica (MATASSOV et al., 2004; KAJSTURA et al., 2007). Esta morte programada também é a por vezes desencadeada quando há parada do ciclo celular mediado pelas proteínas *checkpoint* (PUCCI; KASTEN; GIORDANO, 2000; STEWART; WESTFALL; PIETENPOL, 2003). Neste estudo, a marcação da fosfatidilserina externalizada pelas células HepG2, especialmente após o tratamento por 48 horas, sugere a condução da morte apoptótica como finalização da atividade citotóxica do OE de *C. articulatus*, integrando os achados de citotoxicidade, viabilidade, morfologia e ciclo celular.

Neste sentido, o grupo de Kilani (2008) demonstrou atividade apoptótica similar quando células L1210 foram tratadas com o OE de *C. rotundus*. Adicionalmente, o desencadeamento de apoptose também foi reportado com o uso do OE desta espécie nas linhagens HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe), AMN-3 (adenocarcinoma mamário murino) e GBM (glioblastoma multiforme) (AL-HILLI; AL-JUMAILY; YASEEN, 2010).

As substâncias majoritárias do OE de *C. articulatus* também desencadeiam morte apoptótica em células neoplásicas quando usadas isoladamente. Zhao e colaboradores (2018) e Xu e colaboradores (2018) reportaram a ação do α -pineno como indutor de apoptose em seus estudos *in vitro* do câncer de próstata e do CHC, respectivamente. Por sua vez, o óxido de cariofileno foi demonstrado como indutor apoptótico, dependente da concentração, em linhagens celulares de osteossarcoma e câncer de próstata (PAN et al., 2016; PARK et al., 2011).

Esses dados indicam, portanto, que o OE do rizoma de *C. articulatus* é eficiente em subverter a resistência a morte programada - uma das principais idiosincrasias de células neoplásicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essa característica é altamente relevante no desenvolvimento de novos quimioterápicos em câncer,

uma vez que a desregulação das vias apoptóticas tendem a permitir a sobrevivência da célula tumoral independente de fatores exógenos, promovendo proteção ao estresse oxidativo e hipóxia, enquanto permite o desenvolvimento da massa tumoral (HASSAN et al., 2014).

Um dos principais fatores limitantes ao tratamento essencialmente quimioterápico do CHC é a baixa capacidade dos fármacos em promover a inibição dos tumores estabelecidos e significativamente estender a sobrevida global dos pacientes (RIMASSA; PRESSIANI; MERLE, 2019). Desta forma é imprescindível que os resultados obtidos na pesquisa laboratorial sejam convertidos em benefícios reais na clínica. Neste sentido, as pesquisas com animais representam um dos primeiros passos a serem dados.

Nossos achados demonstraram que a capacidade citotóxica do OE do rizoma de *C. articulatus* pode ser prontamente convertida em uma ação antitumoral em modelo de xenotransplante com células HepG2, apresentando índices de inibição de até 50% após o tratamento. Resultados similares foram obtidos em um ensaio com extratos da *Remirea maritima* (Cyperaceae). Neste estudo, camundongos Suíços inoculados com sarcoma 180 apresentaram inibição de 57,16% e 62,57% na massa tumoral após tratamento com os extratos da planta nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia, respectivamente (DÓRIA et al., 2016). Similarmente o grupo de Chen (2015) demonstrou uma taxa de inibição de 69,1% nos hepatomas induzidos por modelo xenográfico em camundongos nude, após a utilização de α -pineno como estratégia terapêutica.

De acordo com as análises histopatológicas, a retração tumoral observada está associada tanto com a menor proliferação das células tumorais, especialmente na maior dosagem do óleo, quanto ao aumento da morte dessas células, conforme evidenciado pelo acúmulo de áreas necróticas. Todavia, os eventos observáveis nas análises com HE parecem não refletir o tipo de morte predominante nas análises *in vitro*.

No entanto, é digno de nota que as características observáveis na necrose designam as alterações *post mortem*, que independem dos eventos que a ocasionaram (STRZYZ, 2017; FINK; COOKSON, 2005). Desta forma, não é possível descartar que a morte celular possa ser resultado de eventos apoptóticos. Na realidade, a hipovascularização observada nos tumores gerados pode ser um fator crucial para uma possível menor capacidade fagocítica no microambiente tumoral, contribuindo para o acúmulo de corpos apoptóticos, que ao perderem sua integridade culminam em necrose (FINK; COOKSON, 2005).

Adicionalmente, a alta toxicidade associada aos agentes quimioterápicos utilizados na clínica desponta como um dos principais desafios na terapia antineoplásica, sendo este também um dos mais importantes entraves para a inserção de novas drogas neste ramo farmacêutico

(KROSCHINSKY et al., 2017; CLEELAND et al., 2012; GEWIRTZ; BRISTOL; YALOWICH, 2010). Por isso, a segurança das novas estratégias terapêuticas é um dos requisitos mais preconizados no teste de novas substâncias.

Nossos achados iniciais demonstraram que a utilização do óleo essencial nos camundongos está dissociada de sinais de toxicidade, como alterações na massa dos animais, na massa relativa dos órgãos coletados e nos parâmetros hematológicos mensurados. No entanto alguns efeitos adversos foram observados nas análises histopatológicas dos órgãos coletados, sendo o principal destes a hemorragia.

Uma análise detalhada do óleo essencial torna evidente que substâncias como β -pineno, *p*-cimeno, limoneno, terpeno-4-ol e α -terpineol, compõem as frações minoritárias deste OE. Essas substâncias têm sido apontadas por alguns grupos de estudos cardiológicos como agentes vasodiladores, no entanto altas doses seriam necessárias para ocasionar eventos de hemorragia (KHALEEL; TABANCA; BUCHBAUER, 2018; MOREIRA et al., 2016; SILVA et al., 2015; MAIA-JOCA et al., 2014; PEREIRA et al., 2013). Além disso, a hemorragia pulmonar detectada também ocorreu nos grupos controles negativo e positivo, o que sugere que o OE não se comporta como o agente causador de tal efeito.

Outros achados histopatológicos neste estudo, como inflamação focal, congestão vascular e degeneração hidrópica são caracterizados como respostas agudas ao estresse, sendo frequente a reversibilidade ao estado natural da célula após a finalização dos estímulos causadores (RODRIGUES et al., 2019; MILLER; ZACHARY, 2017; ROUILLER, 2013). Apesar disso, as alterações histopatológicas encontradas nos órgãos, sejam estas resultado do estresse induzido com o tratamento, das características das substâncias utilizadas ou da angústia ocasionada durante a eutanásia, sugerem que rins, fígado e pulmões são alvos potenciais de toxicidade e, portanto, outros estudos precisam ser realizados a fim de atestar os resultados encontrados.

Por outro lado, os indícios de citotoxicidade e inibição *in vitro* e *in vivo*, atrelados a grande necessidade do desenvolvimento de novos quimioterápicos para uma neoplasia com alta mortalidade e dificuldade terapêutica como o carcinoma hepatocelular, validam, ainda que de maneira primitiva, a exploração e aperfeiçoamento do óleo essencial do rizoma de *Cyperus articulatus* como um candidato antineoplásico.

8. CONCLUSÕES

Diante dos achados expostos, nosso estudo revelou a predominância de sesquiterpenos e monoterpenos na composição do óleo essencial do rizoma de *C. articulatus*, apresentando como principais substâncias a muscatona, ciccolorenona, α -pineno, pogostol, α -copaeno e óxido de cariofileno. Juntos, essa composição conduziu a uma atividade citotóxica promissora frente a células do carcinoma hepatocelular humano, por promover alterações morfológicas, a parada inicial do ciclo celular na fase G₂/M, seguido de fragmentação do material genético. Em consequência, um aumento no número de células com externalização de fosfatidilserina foi mensurado, sugerindo que o impacto sobre a viabilidade das células HepG2 foi mediado por indução apoptótica. Por fim, o óleo essencial se apresentou eficaz em inibir o carcinoma hepatocelular em modelo de xenotransplante em camundongos. Tais achados denotam o potencial do óleo-teste como candidato ao desenvolvimento de uma nova estratégia quimioterápica para o carcinoma hepatocelular. Contudo, estudos complementares devem ser realizados a fim de delimitar adicionais mecanismos de ação envolvidos na atividade da *C. articulatus*, como a ativação de caspases efetoras, produção de espécies oxidativas, alteração no potencial mitocondrial, bem como alterações ultraestruturais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, W. M. Genomic instability and carcinogenesis: an update. **Current Genomics**, v. 9, n. 8, p. 535-541, 2008.
- ABEL, E. L.; DIGIOVANNI, J. Environmental Carcinogenesis. *In*: MENDELSON, J. *et al.* **The Molecular Basis of Cancer**. 4 ed. Elsevier Inc., 2014. cap. 7, p. 103-128.
- ACS. AMERICAN CANCER SOCIETY. Global Cancer Facts & Figures. 4th Edition. Atlanta: **American Cancer Society**; 2018.
- AL-HILLI, Z. A.; AL-JUMAILY, E. F.; YASEEN, N. Y. Role of volatile oils fraction of cyperus rotundus in induction of apoptosis on cancer cell lines in vitro. **Iraqi Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 286-298, 2010.
- AL-SALAMA, Z. T.; SYED, Y. Y.; SCOTT, L. J. Lenvatinib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. **Drugs**, v. 79, n. 6, p. 665-674, 2019.
- ALVES, M. *et al.* Cyperaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB7174>>. Acesso em: 19 dez. 2019.
- ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Tumour progression and metastasis. **E Cancer Medical Science**, v. 10, 2016.
- BABA, A. I.; CĂTOI, C. **Comparative Oncology**. Bucharest: Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
- BABES, R. M. *et al.* Simple discrimination of sub-cycling cells by propidium iodide flow cytometric assay in Jurkat cell samples with extensive DNA fragmentation. **Cell Cycle**, v. 17, n. 6, p. 766-779, 2018.
- BAGNYUKOVA, T. V. *et al.* Chemotherapy and signaling: How can targeted therapies supercharge cytotoxic agents?. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, n. 9, p. 839-853, 2010.
- BERSAN, S. M. F. *et al.* Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 451, 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. INCA – Coordenação de Prevenção e Vigilância. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro. 2019.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012.

BUM, E. N. *et al.* Anticonvulsant properties of the methanolic extract of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 145-150, 2001.

BUM, E. N. *et al.* Effects of *Cyperus articulatus* compared to effects of anticonvulsant compounds on the cortical wedge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 1, p. 27-34, 2003.

BUTNARIU, M.; SARAC, I. Essential Oils From Plants. **Journal of Biotechnology and Biomedical Science**, v. 1, n. 4, p. 35, 2018.

CARBONE, M.; PASS, H. I. Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen?. *In: Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 2004. p. 399-405.

CERVELLO, M. *et al.* Molecular mechanisms of sorafenib action in liver cancer cells. **Cell Cycle**, v. 11, n. 15, p. 2843-2855, 2012.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559-1564, 2011.

CHEN, W. *et al.* Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 127, n. 3, p. 332-338, 2015.

CHEN, W. *et al.* Inhibitory effects of α -pinene on hepatoma carcinoma cell proliferation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 7, p. 3293-3297, 2014.

CHIK, F.; SZYF, M.; RABBANI, S. A. Role of epigenetics in cancer initiation and progression. *In: Human Cell Transformation*. Springer, New York, NY, 2011. p. 91-104.

CLEELAND, C. S. *et al.* Reducing the toxicity of cancer therapy: recognizing needs, taking action. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 9, n. 8, p. 471, 2012.

COLE, L. A.; KRAMER, P. R. Human Cancer and Carcinogenesis. *In: COLE, L. A.; KRAMER, P. R. Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*. Academic Press, 2015. cap. 6.3, p. 197-200.

COLEMAN, W. C. Neoplasia. *In: COLEMAN, W. B.; TSONGALIS, G. J. Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease*. 2 ed. Elsevier, 2018. cap. 4, p. 71-97.

COSTA, R. G. A. *et al.* In vitro and in vivo growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) leaf essential oil. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 122, n. 109713, 2020.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.

CROWLEY, L. C.; CHOJNOWSKI, G.; WATERHOUSE, N. J. Measuring the DNA content of cells in apoptosis and at different cell-cycle stages by propidium iodide staining and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 10, p. pdb. prot087247, 2016.

- DESMARCHELIER, C. *et al.* Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 4, p. 288-296, 1997.
- DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 2008.
- DI GIACOMO, S. *et al.* Chemosensitization of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by β -caryophyllene oxide-induced inhibition of ABC export pumps. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 623-634, 2019.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.
- DÓRIA, G. A. A. *et al.* In vivo antitumor effect, induction of apoptosis and safety of *Remirea maritima* Aubl. (Cyperaceae) extracts. **Phytomedicine**, v. 23, n. 9, p. 914-922, 2016.
- DUARTE, M. C. T. *et al.* Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.
- ECKHOUSE, S.; LEWISON, G.; SULLIVAN, R. Trends in the global funding and activity of cancer research. **Molecular Oncology**, v. 2, n. 1, p. 20-32, 2008.
- EDIRIWEERA, M. K.; TENNEKOON, K. H.; SAMARAKOON, S. R. In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. **Journal of Applied Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 38-71, 2019.
- EHRENSTEIN, M. R.; MAURI, C. If the treatment works, do we need to know why?: the promise of immunotherapy for experimental medicine. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 10, p. 2249-2252, 2007.
- ELSHAFIE, H. *et al.* Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1435, 2017.
- ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I. An overview of the biological effects of some mediterranean essential oils on human health. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- FERRAZ, R. P. C. *et al.* Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615-621, 2013.
- FIDYT, K. *et al.* β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.
- FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 1907-1916, 2005.
- FORNER A.; REIG M.; BRUIX J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**. v. 391, n. 10127, p. 1301-1314, 2018.
- GELBAND, H. *et al.* **Cancer Control Opportunities in Low-and Middle-income Countries**. National Academies Press, 2007.

GEWIRTZ, D. A.; BRISTOL, M. L.; YALOWICH, J. C. Toxicity issues in cancer drug development. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 11, n. 6, p 612, 2010.

GHOURI, Y. A.; MIAN, I.; ROWE, J. H. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. **Journal of Carcinogenesis**, v. 16, 2017.

GRAHAM, J. G. *et al.* Plants used against cancer—an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 3, p. 347-377, 2000.

GRIZZI, F. *et al.* Cancer initiation and progression: an unsimplifiable complexity. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 3, n. 1, p. 37, 2006.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309-322, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HASSAN, M. *et al.* Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

HASSANEIN, H. D. *et al.* Chemical diversity of essential oils from *Cyperus articulatus*, *Cyperus esculentus* and *Cyperus papyrus*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 2, p. 251-264, 2014.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127-129, 2017.

HIDA, K. *et al.* Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1272, 2018.

HUANG, M. *et al.* Terpenoids: natural products for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 12, p. 1801-1818, 2012.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estatísticas de Câncer. **Instituto Nacional de Câncer**. Ministério da Saúde, 2020a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 07 abr. 2020.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Taxas de mortalidade por câncer de fígado e vias biliares intra-hepáticas. **Instituto Nacional de Câncer**. Ministério da Saúde, 2020b. Disponível em:< <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo03/consultar.xhtml#panelResultado>>. Acesso em: 09 abr. 2020.

JAKÓBISIAK, M.; LASEK, W.; GOŁĄB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunology Letters**, v. 90, n. 2-3, p. 103-122, 2003.

JAYAPRAKASHA, G. K. *et al.* Chemical composition of volatile oil from *Citrus limettioides* and their inhibition of colon cancer cell proliferation. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 200-207, 2013.

JHUNJHUNWALA, S. *et al.* Diverse modes of genomic alteration in hepatocellular carcinoma. **Genome Biology**, v. 15, n. 8, p. 436, 2014.

JIN, Y. *et al.* Circulating microRNAs as potential Diagnostic and prognostic Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

KAJSTURA, M. *et al.* Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. **Cytometry Part A: The journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 71, n. 3, p. 125-131, 2007.

KANAVOS, P. The rising burden of cancer in the developing world. **Annals of Oncology**, v. 17, n. suppl_8, p. viii15-viii23, 2006.

KANG, E. *et al.* α -Pinene inhibits tumor invasion through downregulation of nuclear factor (NF)- κ B-regulated matrix metalloproteinase-9 gene expression in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Applied Biological Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 511-516, 2016.

KARADEMIR, S. Staging of hepatocellular carcinoma. **Hepatoma Research**, v. 4, p. 58, 2018.

KAVAZ, D.; IDRIS, M.; ONYEBUCHI, C. Physiochemical characterization, antioxidative, anticancer cells proliferation and food pathogens antibacterial activity of chitosan nanoparticles loaded with cyperus articulatus rhizome essential oils. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 837-845, 2019.

KHALEEL, C.; TABANCA, N.; BUCHBAUER, G. α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. **Open Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 349-361, 2018.

KHAN, H. Medicinal plants in light of history: recognized therapeutic modality. **Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine**, v. 19, n. 3, p. 216-219, 2014.

KHAZAEI, S. *et al.* Promotion of HepG2 cell apoptosis by flower of *Allium atroviolaceum* and the mechanism of action. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 104, 2017.

KILANI, S. *et al.* Comparative study of *Cyperus rotundus* essential oil by a modified GC/MS analysis method. Evaluation of its antioxidant, cytotoxic, and apoptotic effects. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 5, p. 729-742, 2008.

KINOSHITA, A. *et al.* Staging systems for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 3, p. 406, 2015.

KIUCHI, F. *et al.* Inhibition of prostaglandin biosynthesis by the constituents of medicinal plants. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 10, p. 3391-3396, 1983.

KNTAYYA, S. B. *et al.* Induction of apoptosis and cytotoxicity by isothiocyanate sulforaphane in human hepatocarcinoma HepG2 cells. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 718, 2018.

KOOTI, W. *et al.* Effective medicinal plant in cancer treatment, part 2: review study. **Journal of Evidence-based Complementary & Alternative Medicine**, v. 22, n. 4, p. 982-995, 2017.

KOW, A. W. C. Transplantation versus liver resection in patients with hepatocellular carcinoma. **Translational Gastroenterology and Hepatology**, v. 4, 2019.

KROSCHINSKY, F. *et al.* New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 89, 2017.

KUMMAR, S. *et al.* Drug development in oncology: classical cytotoxics and molecularly targeted agents. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 15-26, 2006.

KURUPPU, A. I.; PARANAGAMA, P.; GOONASEKARA, C. Medicinal plants commonly used against cancer in traditional medicine formulae in Sri Lanka. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2019.

LEE, E. Y. H. P; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, p. a003236, 2010.

LENCIONI, R.; PETRUZZI, P.; CROCETTI, L. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *In: Seminars in Interventional Radiology*. Thieme Medical Publishers, 2013. p. 003-011.

LIN, C. H. *et al.* The Ethanol Crude Extraction of Cyperus Rotundus Regulates Apoptosis-associated Gene Expression in HeLa Human Cervical Carcinoma Cells In Vitro. **Anticancer Research**, v. 39, n. 7, p. 3697-3709, 2019.

LIN, Y.; XU, J.; LAN, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 12, n. 1, p. 76, 2019.

LIU, T. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, 2019.

LODISH, H. *et al.* Molecular cell biology 4th edition. **National Center for Biotechnology Information, Bookshelf**, 2000.

LONDON W. T. *et al.* **Cancer Epidemiology and Prevention**. New York: Oxford University Press. 4 ed, 2018. p. 635-660.

LOŽIENĖ, K.; VENSKUTONIS, P. R. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 5, p. 517-525, 2005.

LUO, Y.; LEVERSON, J. D. New opportunities in chemosensitization and radiosensitization: modulating the DNA-damage response. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 5, n. 2, p. 333-342, 2005.

MAIA-JOCA, R. P. M. *et al.* Investigation of terpinen-4-ol effects on vascular smooth muscle relaxation. **Life Sciences**, v. 115, n. 1-2, p. 52-58, 2014.

MANNARREDDY, P. *et al.* Cytotoxic effect of *Cyperus rotundus* rhizome extract on human cancer cell lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1375-1387, 2017.

- MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G.; MÜLLER-DECKER, K. Tumor promotion as a target of cancer prevention. *In: Cancer Prevention*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. p. 37-47.
- MATASSOV, D. *et al.* Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. *In: Apoptosis Methods and Protocols*. Humana Press, 2004. p. 1-17.
- MEMARIANI, T. *et al.* Evaluation of the cytotoxic effects of *Cyperus longus* extract, fractions and its essential oil on the PC3 and MCF7 cancer cell lines. **Oncology Letters**, v. 11, n. 2, p. 1353-1360, 2016.
- MÉNDEZ-BLANCO, C. *et al.* Sorafenib resistance in hepatocarcinoma: role of hypoxia-inducible factors. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 10, p. 1-9, 2018.
- MÉRY, B. *et al.* In vitro cell death determination for drug discovery: A landscape review of real issues. **Journal of Cell Death**, v. 10, p. 1179670717691251, 2017.
- METUGE, J. A. *et al.* Anti-Onchocerca activity and phytochemical analysis of an essential oil from *Cyperus articulatus* L. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 223, 2014a.
- METUGE, J. A. *et al.* Anti-onchocerca metabolites from *Cyperus articulatus*: Isolation, in vitro activity and in silico 'drug-likeness'. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 4, n. 4, p. 243-249, 2014b.
- MIERKE, C. T. Initiation of a Neoplasm or Tumor. *In: MIERKE, C. T. Physics of Cancer: Volume 1*. 2 ed. IOP Publishing, 2015. cap. 1, p. 1-54.
- MILLER, M. A.; ZACHARY, J. F. Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. *In: ZACHARY, J. F. Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 6 ed. Elsevier Health Sciences, 2017, cap 1, p. 2-43.
- MILLS, C. C.; KOLB, E. A.; SAMPSON, V. B. Development of chemotherapy with cell-cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy. **Cancer Research**, v. 78, n. 2, p. 320-325, 2018.
- MONGELLI, E. *et al.* Antimicrobial activity and interaction with DNA of medicinal plants from the Peruvian Amazon region. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 27, n. 4, p. 199-203, 1995.
- MOON, J. J.; LU, A.; MOON, C. Role of genomic instability in human carcinogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 244, n. 3, p. 227-240, 2019.
- MOREIRA, I. J. A. *et al.* Characterization and Antihypertensive Effect of the Complex of (-)- β -pinene in β -cyclodextrin. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 837-845, 2016.
- NICOLI, C. M. L. *et al.* Aproveitamento da biodiversidade amazônica: o caso da piriococa. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.
- NIU, L. *et al.* New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: responsible mechanisms and promising strategies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 2, p. 564-570, 2017.

OLADOSU, I. A. *et al.* Antibacterial activity of rhizomes essential oils of two types of *Cyperus articulatus* growing in Nigeria. **Journal of Advanced Biomedical Research**, v. 5, n. 3, p. 179-183, 2011.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer Tomorrow – Estimated number of deaths from 2018 to 2040, liver, both sexes, all ages. **World Health Organization**, 2019b. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphicisotype?type=1&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0>. Acesso em: 18 dez. 2019.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer Tomorrow. **World Health Organization**, 2019a. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphicisotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0>. Acesso em: 18 dez. 2019.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer. **World Health Organization**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 18 dez. 2019.

PAN, Z. *et al.* Caryophyllene oxide exhibits anti-cancer effects in MG-63 human osteosarcoma cells via the inhibition of cell migration, generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 817-823, 2016.

PARK, K. *et al.* β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer Letters**, v. 312, n. 2, p. 178-188, 2011.

PARK, S. E. *et al.* Induction of apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells with an ethanol extract of *Cyperus rotundus* L. by activating caspases. **Oncology Reports**, v. 32, n. 6, p. 2461-2470, 2014.

PEREIRA, S. *et al.* Vasodilator activity of the essential oil from aerial parts of *Pectis brevipedunculata* and its main constituent citral in rat aorta. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3072-3085, 2013.

PODOLSKIY, D. I.; GLADYSHEV, V. N. Intrinsic versus extrinsic cancer risk factors and aging. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 10, p. 833-834, 2016.

PUCCI, B.; KASTEN, M.; GIORDANO, A. Cell cycle and apoptosis. **Neoplasia (New York, NY)**, v. 2, n. 4, p. 291, 2000.

PUCCI, C.; MARTINELLI, C.; CIOFANI, G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. **E Cancer Medical Science**, v. 13, 2019.

RAKOTONIRINA, V. S. *et al.* Sedative properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 22-29, 2001.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

- RATAIN, M. J.; PLUNKETT, W. K. General Mechanisms of Drug Action. In: HOLLAND, J. F.; POLLOCK, R. E. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 6 ed. Pmph Bc Decker Inc., 2003. cap 46.
- REYNOLDS, J. V.; DONOHOE, C. L.; DOYLE, S. L. Diet, obesity and cancer. **Irish Journal of Medical Science**, v. 180, n. 2, p. 521-527, 2011.
- RHIM, H.; LIM, H. K. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: pros and cons. **Gut and Liver**, v. 4, n. Suppl 1, p. S113, 2010.
- RIMASSA, L.; PRESSIANI, T.; MERLE, P. Systemic Treatment Options in Hepatocellular Carcinoma. **Liver Cancer**, p. 1-20, 2019.
- ROCHA, A. E. S. As espécies de Cyperaceae *Juss.* conhecidas como Priprioca. In: POTIGUARA, R. C. V., ZOGHBI, M. G. B. (Org.) **Priprioca um Recurso Aromático do Pará**. Belém, MPEG, UEPA, 2008. p. 13-24.
- RODRIGUES, A. C. B. C. *et al.* In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 516-524, 2019.
- RODRIGUES, A. C. B. C. *et al.* Antitumor properties of the essential oil from the leaves of *Duguetia gardneriana*. **Planta Medica**, v. 81, n. 10, p. 798-803, 2015.
- ROUILLER, C. **The liver: morphology, biochemistry, physiology**. Academic Press, 2013.
- RUKUNGA, G. M. *et al.* Anti-plasmodial activity of the extracts and two sesquiterpenes from *Cyperus articulatus*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 3, p. 188-190, 2008.
- RUKUNGA, G. M. *et al.* Anti-plasmodial activity of the extracts of some Kenyan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 282-285, 2009.
- SANCHEZ-VEGA, F. *et al.* Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 321-337. e10, 2018.
- SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.
- SCHULZE, K.; NAULT, J.; VILLANUEVA, A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 5, p. 1031-1042, 2016.
- SHARIFI-RAD, J. *et al.* Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.
- SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2010.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 00, n. 0, p. 1-24, 2017.

- SILVA, M. *et al.* The vasorelaxant effect of p-Cymene in rat aorta involves potassium channels. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.
- SILVA, N. C. *et al.* In vitro and in vivo antimalarial activity of the volatile oil of *Cyperus articulatus* (Cyperaceae). **Acta Amazonica**, v. 49, n. 4, p. 334-342, 2019.
- SILVA, T. B. C. *et al.* Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 199, 2016.
- STEWART, Z. A.; WESTFALL, M. D.; PIETENPOL, J. A. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 3, p. 139-145, 2003.
- STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.
- STRZYZ, P. Cell death: pulling the apoptotic trigger for necrosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 2, p. 72, 2017.
- SUDHA, S.; MASILAMANI, S. M. Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived actinomycete *Streptomyces avidinii* strain SU4. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 10, p. 770-773, 2012.
- SUFFNESS, M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**, v. 6, p. 71-133, 1990.
- SUN, T.; LIU, H.; MING, L. Multiple roles of autophagy in the sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 716-727, 2017.
- SUSIANTI, S. *et al.* The cytotoxic effects of purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) Tuber essential oil on the hela cervical cancer cell line. **Pakistan Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 77-81, 2018.
- SVORONOS, A. A.; ENGELMAN, D. M.; SLACK, F. J. OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. **Cancer Research**, v. 76, n. 13, p. 3666-3670, 2016.
- TAYLOR, L. Piri-piri. The Tropical Plant Database. **Raintree**, 2006. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/piri-piri.htm>>. Acesso em: 19 dez. 2019.
- THOPPIL, R. J.; BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World Journal of Hepatology**, v. 3, n. 9, p. 228, 2011.
- THORGEIRSSON, S. S.; GRISHAM, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Nature Genetics**, v. 31, n. 4, p. 339, 2002.
- TORRE, L. A. *et al.* Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.
- TURKEZ, H. *et al.* Cytotoxic and cytogenetic effects of α -copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. **Biologia**, v. 69, n. 7, p. 936-942, 2014.

- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.
- VILLANUEVA, A. Hepatocellular Carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 15, p. 1450-1460. 2019.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 789, 2004.
- WANG, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761, 2017.
- WEIS, S. *et al.* Percutaneous ethanol injection or percutaneous acetic acid injection for early hepatocellular carcinoma. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2015.
- WOGAN, G. N. *et al.* Environmental and chemical carcinogenesis. *In: Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 2004. p. 473-486.
- WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.
- WU, S. *et al.* Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2018.
- XU, Q. *et al.* α -pinene regulates miR-221 and induces G2/M phase cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 6, 2018.
- YAGI, S. *et al.* Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 8, p. 763-770, 2016.
- ZHANG, B. *et al.* microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Developmental Biology**, v. 302, n. 1, p. 1-12, 2007.
- ZHAO, Y. *et al.* α -Pinene inhibits human prostate cancer growth in a mouse xenograft model. **Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 1-7, 2018.
- ZHOU, K.; LIU, M.; CAO, Y. New insight into microRNA functions in cancer: oncogene–microRNA–tumor suppressor gene network. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, p. 46, 2017.
- ZHU, W.; WU, S.; HANNUN, Y. A. Contributions of the Intrinsic Mutation Process to Cancer Mutation and Risk Burdens. **EBioMedicine**, v. 24, p. 5, 2017.
- ZHU, Y. *et al.* New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 5, p. 614, 2017.
- ZOGHBI, M. G. B. *et al.* Yield and chemical composition of the essential oil of the stems and rhizomes of *Cyperus articulatus* L. cultivated in the state of Para, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 10-12, 2006.

ZOGHBI, M. G.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. A. Química das espécies de *Cyperus* conhecidas por Priprioca. *In:* (Ed.). **Priprioca um recurso aromático do Pará**. Belém: UFPA, 2008. p.53-76.