

INIBIÇÃO DE METALOPROTEINASES POR EXTRATOS AQUOSOS DE *ALOE VERA*, *ANNONA MURICATA* E CHÁ PRETO

INHIBITION OF METALLOPROTEINASES BY *ALOE VERA*, *ANNONA MURICATA*, AND BLACK TEA AQUEOUS EXTRACTS

Rosy Iára Maciel A. RIBEIRO¹; Juliana Sayuri KURIBAYASHI²;
Paulo Cesar BORGES JÚNIOR²; Marcelo Emílio BELETTI³; Foued Salmen ESPINDOLA⁴;
Geovanni Dantas CASSALI⁵; Adriano Mota LOYOLA⁶.

1. Professora, Doutora, Universidade Federal de São João Del-Rei/Campus Centro-Oeste – UFSJ-CCO, Divinópolis, MG, Brasil. rosy@ufsj.edu.br, rosyara@gmail.com; 2. Mestre, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 3. Professor, Doutor, Instituto de Ciências Biomédicas - UFU, Uberlândia, Brasil; 4. Professor, Doutor, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Genética e Bioquímica - UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 5. Professor, Doutor, Laboratório de Patologia Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil; 6. Professor, Doutor, Laboratório de Patologia Oral - UFU, Uberlândia, MG, Brasil.

RESUMO: As Metaloproteinases de Matriz (MMPs) podem exercer importantes funções na remodelagem fisiológica e patológica da matriz extracelular. Elas são implicadas na progressão tumoral de muitas malignidades humanas interferindo em eventos angiogênicos, invasivos e metastáticos. Produtos obtidos de algumas plantas têm sido consistentemente associados a funções neoplásicas, possivelmente por reproduzir a atividade neutralizadora dos inibidores teciduais (TIMPs) das MMPs. No presente trabalho, investigou-se a inibição da atividade gelatinolítica das MMPs -2 e -9 por extratos aquosos (EA) de *Aloe vera*, chá preto e *Annona muricata* diluídos em tampão de ativação (TA, com cálcio). A atividade proteolítica das MMPs foi avaliada em ensaios zimográficos. Para avaliar o efeito inibitório dos produtos testados, géis foram seccionados e incubados em soluções contendo o TA e os EA em três diluições seriadas. Associação indireta foi observada entre o EA de *A. vera* e chá preto e a inibição da atividade de MMP-2. EA de *A. muricata* exerceu pequeno efeito inibitório na MMP-2 nas duas menores diluições. A atividade de MMP-9 foi consistentemente neutralizada por todos os EA testados, de forma dose-dependente. Estes resultados sugerem que os efeitos antitumorais verificados para os EA de *A. vera*, *A. muricata*, e chá preto podem ser explicados parcialmente por sua atividade inibitória sobre as MMP-2 e -9.

PALAVRAS-CHAVE: Metaloproteinases de matriz. Zimografia. Graviola. Babosa. *Camellia sinensis*. Plantas. Inibição.

INTRODUÇÃO

O termo Metaloproteinases de Matriz (MMPs) descreve uma família de até 20 enzimas, as quais são hábeis em degradar constituintes da matriz extracelular (MEC). Ao remodelar a MEC, as MMPs acabam exercendo funções importantes tanto em estados fisiológicos, quanto patológicos (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001). Duas MMPs denominadas gelatinases A e B, as MMP-2 e MMP-9, respectivamente, são sintetizadas e secretadas na MEC por muitas células, como queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e também por várias células neoplásicas (KERKELÄ; SAARIALHO-KERE, 2003). São especialmente hábeis em degradar colágeno tipo IV, o principal constituinte da membrana basal (MB). Neste processo, revelam moléculas com funções variadas, como fatores de crescimento e migração celular, para os quais são atribuídas variadas funções na carcinogênese (NAGASE; VISSÉ; 2003). Desta forma, as MMPs têm sido consistentemente

implicadas na progressão tumoral de muitas malignidades humanas, como carcinomas de cólon, esôfago, mama, cabeça e pescoço e pulmão (SAMANTARAY et al., 2004; LI et al., 2005), interferindo em eventos angiogênicos, invasivos e metastáticos (CHANG; MOOK et al., 2004; WERB, 2001).

Inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) são os principais inibidores das MMPs. TIMPs também são conhecidos por exercer funções na embriogênese, carcinogênese e inflamação. Neste contexto, o equilíbrio entre as atividades de MMPs e TIMPs pode ser crítica na determinação da remodelagem ou degradação da MEC, em condições normais e também em condições patológicas (BREW et al., 2000; ZHOU; NOTHNICK, 2005;).

Muitos produtos naturais têm sido testados contra a carcinogênese (LAMBERT et al., 2005; SEO et al., 2005). Plantas do gênero *Aloe* são usadas medicinalmente há séculos. Delas, a *Aloe vera* é a planta mais amplamente utilizada na cicatrização (DWECK; REYNOLDS, 1999). Também existem

relatos na literatura sobre estudos dos efeitos antitumorais desta espécie (CORSI et al., 1998; KIM et al., 1999). Plantas *Annona* são usadas na medicina tradicional e são mencionadas como uma das plantas medicinais no Brasil (WANG et al., 2002). A *Annona muricata*, conhecida como “Graviola”, apresenta acetogeninas anonáceas em sua constituição, estas substâncias possuem propriedades anti-neoplásicas bem definidas (LIAW et al., 2002). Capacidade similar foi identificada na *Camellia sinensis*, planta da qual se obtém os chás verde e preto. No Brasil, o chá preto é mais consumido do que o chá verde. Investigações mostram que ambos os chás reduzem significativamente o risco relativo para muitos cânceres (SIDDIQUI et al., 2004; WU et al., 2003). A *C. sinensis* é uma planta rica em polifenóis. Dentre os polifenóis, os taninos são um grande grupo presente nestas plantas, alguns dos quais são benéficos por suas atividades quimiopreventivas (LIU et al., 2004). As catequinas são polifenóis que exercem efeitos quimioprotetores contra iniciação, promoção e progressão tumoral (DEMEULE et al., 2000). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que ingestão freqüente de chá verde foi significativamente associada com menor risco de desenvolvimento de carcinoma de próstata (HEILBRUN et al., 1986). Experimentos com roedores demonstraram que as substâncias presentes na *C. sinensis* inibiram crescimento e invasão tumoral (GARBISA et al., 2001; LIAO et al., 1995). Estes efeitos foram atribuídos à neutralização da atividade das MMPs secretadas pelas células tumorais (SAZUKA et al., 1997).

Desta forma, alguns produtos naturais têm sido constantemente associados a efeitos antitumorais, possivelmente por reproduzir a função dos TIMPs. Estes achados reforçam a necessidade de estudos futuros para elucidar como extratos vegetais podem atuar nos diferentes contextos fisiológicos e patológicos. No presente trabalho, nós investigamos a inibição da atividade das MMPs 2 e 9 por extratos aquosos (EA) de *Aloe vera*, chá preto e *Annona muricata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção dos extratos liofilizados

Inicialmente foram produzidas infusões com água deionizada (p/v) com parênquima de folhas da Babosa [1:50]; folhas secas da Graviola [1:5] [depositadas no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU) sob números 43316 e 43227, respectivamente], e com um sachê do chá preto [1:10] (obtido de Leão Ltda., Curitiba, Brasil). As

soluções foram filtradas e os filtrados foram liofilizados, ou seja, evaporados sob pressão reduzida até que toda a água fosse evaporada, fornecendo um resíduo viscoso ou em pó (PURICELLI et al., 2003). Após isto, os extratos liofilizados foram diluídos (1mg/mL) em tampão de ativação (TA: 50 mM Tris HCl, 6 mM CaCl₂).

Ensaio com as metaloproteinases

Para a análise zimográfica, a atividade proteolítica das MMPs foi avaliada em mini-gel de eletroforese (poliacrilamida 8%, gelatina 0,1%). A eletroforese (BioRad Protean II) foi realizada sob condições redutoras (0,025M TRIS, 0,192 M glicina, e 0,1% SDS, pH 8,5) a 100V constantes por 3hs, a 4°C. Cada poço do gel foi carregado com 0,1g/mL com cada uma das MMPs (2 e 9) (Oncogene Research Products, San Diego, USA, referencias PF023 e PF024, respectivamente), como recomendado pelos fabricantes. Após isso, os géis foram lavados duas vezes em Triton X-100 (2,5%) (v/v) para remover o SDS.

Os géis foram seccionados e direcionados às diferentes soluções. Para estímulo da atividade proteolítica das MMPs, incubou-se uma fração do gel (14 horas a 37 °C) no tampão de ativação. As outras frações foram direcionadas para três diluições seriadas dos extratos vegetais (fator de diluição igual a 2), nas mesmas condições para avaliar os efeitos inibitórios dos produtos testados.

Os géis foram subsequentemente corados (0,25% Comassie blue G-250, etanol 30%, e ácido acético a 10%, por 1 h, sob suave rotação) e descorados (etanol 30%, ácido acético a 10%, por 2 h). Bandas claras no fundo escuro foram visualizadas nos mini-géis após ativação enzimática, sugerindo ativação por Ca²⁺ das MMP-2 e -9, o que representa sua atividade gelatinolítica.

Avaliação zimográfica

Imagens digitais dos géis em tons de cinza (*grayscale*) foram obtidas através de *scanner* de imagens HP Scanjet 8200. As bandas foram segmentadas através de *threshold* e, através de rotinas criadas em ambiente de programação *Scilab* calculou-se a média e o coeficiente de variação dos valores dos “pixels” de cada banda (BELETTI; COSTA, 2004; WALDEMARIN et al., 2004).

RESULTADOS

Os extratos das plantas obtidos após liofilização apresentaram propriedades inibitórias sobre a atividade das MMPs 2 e 9, o que pôde ser visualizado na zimografia (figura 1). A atividade

proteolítica das MMPs foi visualizada pelas bandas claras no fundo escuro dos géis, sendo que o tamanho das bandas foram inversamente proporcionais à capacidade inibitória dos EAs. A inibição das MMPs foi avaliada por análise comparativa das imagens das bandas presentes nos géis controles com as imagens das bandas dos géis submetidos aos tratamentos.

Os extratos de *Aloe vera*, *A. muricata* e chá preto inibiram a atividade das Metaloproteínas 2 e 9.

Associação direta foi observada entre a concentração dos extratos aquosos da *Aloe vera* e do chá preto e a inibição da atividade da MMP-2. O EA de *Annona muricata* exerceu somente pequena inibição na atividade da MMP-2 nas duas menores diluições. A atividade da MMP-9 foi consistentemente neutralizada por todos os extratos vegetais de forma dose-dependente.

DISCUSSÃO

Muitas espécies de plantas medicinais são usadas em terapias alternativas contra vários tipos de câncer (SEO et al., 2005). Estas plantas têm sido usadas medicinalmente por séculos, dentre elas, a *A. vera*, *A. muricata* e *C. sinensis* (DWECK; REYNOLDS, 1999; PECERE et al., 2000). Os mecanismos envolvidos no controle de doenças por estas plantas são desconhecidos. Desta forma, há

uma eminente necessidade de novas investigações relacionadas aos efeitos desses fitoterápicos nos diferentes estágios da carcinogênese e progressão tumoral. No presente estudo, reportou-se a atividade inibitória dos extratos aquosos de *Aloe vera*, *Annona muricata*, e chá preto sobre a atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9.

Tentativas de se avaliar comparativamente a eficiência da inibição enzimática testando extratos de diversas plantas devem ser cuidadosamente observadas, pois dependendo do método de extração, obtêm-se moléculas variadas. Estas possuem características químicas e estruturais diversas e inúmeros princípios ativos não totalmente conhecidos. Neste trabalho optou-se por usar o extrato aquoso por ser esta a forma popular do uso destas plantas.

Observou-se que todos os extratos aquosos obtidos destes produtos foram hábeis em inibir a atividade das MMPs. O EA de *Aloe vera* foi associado com o maior nível do efeito inibidor, seguido pelo EA de chá preto e EA de *Annona muricata*. A atividade proteolítica das MMPs foi visualizada pelas bandas claras no fundo escuro dos géis, sendo que o tamanho das bandas foram inversamente proporcionais à capacidade inibitória dos EAs e diretamente associadas às diluições feitas em todos os testes, com exceção para o EA de *Annona muricata*, em relação à MMP-2 (Figura 1).

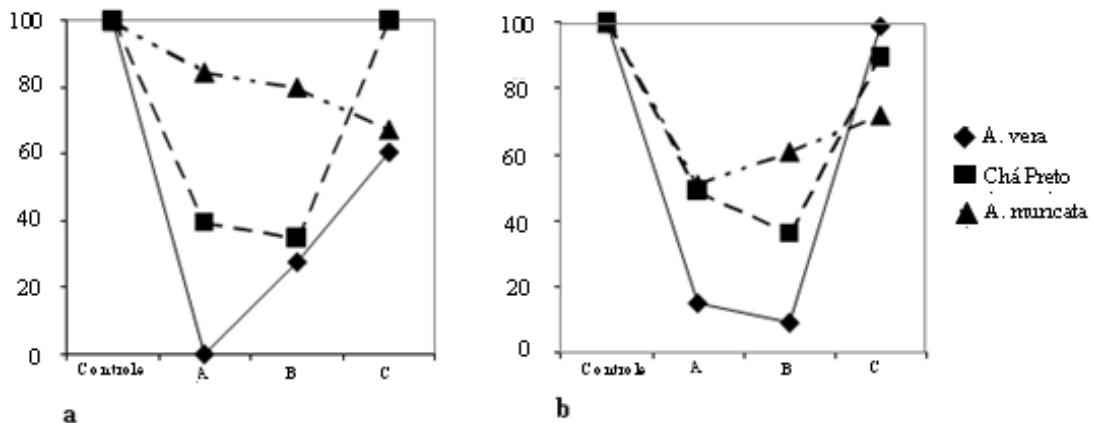


Figura 1. Inibição da atividade gelatinolítica das MMPs (a- MMP-2, b- MMP-9) por extratos aquosos de *Aloe vera*, chá preto, e *Annona muricata*. O eixo x representa a quantidade de pixels (%) das bandas quando comparadas ao controle. O eixo y representa a diluição dos extratos aquosos: "controle" = somente Tampão de ativação, "A" = 1mg/mL, "B" = 0,5mg/mL, "C" = 0,25mg/mL. revista.

Avaliação zimográfica tem sido proposta com pré-incubação das enzimas testadas com seus inibidores (CHENG et al., 2003; TATE et al., 2004). No presente trabalho, incubaram-se os géis nos extratos aquosos após o zimograma das MMPs. Este método, aparentemente, não interfere com os

resultados, uma vez que a inibição das MMPs foi reproduzida testando as diferentes diluições, expressa por uma curva dose-resposta.

Catequinas são polifenóis também presentes na *Camelia sinensis*. Já está bem estabelecido na literatura que estas substâncias são capazes de inibir

a atividade gelatinolítica das MMPs (GARBISA et al., 2001). Além disso, elas atuam como antioxidantes e impedem crescimento celular, morfogênese, e progressão tumoral (LIAO et al., 1995; SIDDIQUI et al., 2004; WU et al., 2003). No chá verde, a epigalocatequina-3-galate (EGCg) é uma catequina com grande efeito inibidor. Esta ação se dá pela união desta molécula ao sítio ativo da MMP-2 (CHENG et al., 2003). Na produção do chá preto, há uma redução notável da concentração dos polifenóis devido às reações de fermentação. Apesar disto, o chá preto foi hábil em inibir fortemente as duas MMPs testadas. Este achado sugere que apesar das doses aparentemente menores, a EGCg presente, isolada ou associada a outras catequinas, foi eficiente na neutralização da enzima, indicando que o processo de produção do chá preto não interfere totalmente nesta capacidade.

A *Aloe vera*, planta reconhecida por sua capacidade cicatrizante, tem sido estudada por seus efeitos citotóxicos em células tumorais (DWECK; REYNOLDS, 1999). Neste trabalho observou-se que *Aloe vera* também apresenta uma notável capacidade inibitória, dose-dependente, da atividade gelatinolítica das MMPs. Isto pode ser parcialmente explicado pela capacidade antitumoral proposta por Pecere et al. (2000). Estes achados endossam a necessidade de futuras investigações das funções anti-neoplásicas desta planta.

O extrato de *Annona muricata* não inibiu a atividade gelatinolítica da MMP-2. Sobre a MMP-9, aproximadamente 50% de inibição foi observada na

primeira diluição, seguida de resposta dose-dependente, como observado para *Aloe vera* e chá preto. Acetogeninas presentes na *A. muricata* são associadas com significativos efeitos antitumorais como toxicidade seletiva contra muitos tipos de células neoplásicas (CHANG, WANG et al., 2002; WU, 2001). Estudos comparativos entre doxorubicina e *A. muricata*, demonstraram uma eficiência desta planta de 103 a 105 vezes maior na inibição do crescimento tumoral (GU et al., 1994; KIM et al., 2001; WASSERMAN et al., 2002). Uma vez que MMPs participam nos processos neoplásicos fundamentais como invasão e progressão tumoral, e o efeito inibitório do extrato aquoso de *A. muricata* sobre a MMP-9, como foi bem demonstrado neste trabalho, poderia ser relevante avaliar a atividade neutralizadora de diferentes acetogeninas presentes no extrato de *Annona muricata*.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados sugerem que os efeitos antitumorais de *Aloe vera*, *Annona muricata* e *Camellia sinensis* podem ser parcialmente explicados por sua capacidade de inibir a atividade proteolítica das MMPs. Esses achados evocam adicionais estudos para esclarecer a relação entre estas plantas e os mecanismos do desenvolvimento e progressão tumoral, pois novas terapias podem surgir destas investigações

ABSTRACT: Matrix metalloproteinases may exert important roles in both physiologic and pathologic extracellular matrix remodeling. They have been implicated in tumoral progression of many human malignancies interfering on angiogenic, invasive, and metastatic events. Products obtained from some plants have been consistently associated to anti-neoplastic roles, possibly by reproducing the neutralizing activity of tissue inhibitors over MMPs. In the present work, we investigate the inhibition of the MMP-2 and -9 gelatinolytic activity by *Aloe vera*, black tea, and *Annona muricata* aqueous extracts (AE) diluted in activation buffer (AB, with calcium). The proteolytic activity of MMP was evaluated on zymographic assays. To evaluate the inhibitory effect of the tested products, gels were sectioned and incubated in the solutions containing the AB and AE from three serial dilutions. Indirect association was observed between the dilution of *A. vera* and black tea and MMP-2 activity inhibition. *A. muricata* exerted only small inhibition on MMP-2 effect in the two smallest dilutions. The MMP-9 activity was consistently neutralized by all of the natural solutions in a dose-dependent way. The present results suggest that the antitumoral effects verified for *A. vera*, *A. muricata*, and black tea AE may be partially explained by their inhibitory activity on MMP.

KEYWORDS: Matrix metalloproteinases. Zymography. Graviola. Babosa. *Camellia sinensis*. *Annona muricata*. Plants. Inhibition.

REFERENCIAS

BELETTI, M. E.; COSTA, L da F. A systematic approach to multispecies sperm morphometric characterization. **Analytical and quantitative cytology and histology**, St. Louis, v. 25, n. 2. p. 97-107, 2004.

BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinase: evolution, structure and function. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1477, p. 97-107. 2004.

CORSI, M. M.; BERTELLI, A. A.; GAJA, G. ; FULGENZI, A.; FERRERO, M. E. The therapeutic potential of *Aloe vera* in tumor-bearing rats. **International journal of tissue reactions**, Geneva, v. 20, p. 115-118, 1998.

CHANG, C. WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology*. Cambridge, V. 11, p. 37-43. 2001.

CHANG, F. R.; WU, Y. C., Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*, **Journal of natural products**, Ohio, v. 64, p. 925-931. 2001.

CHENG, X. W.; KUZUYA, M.; KANDA, S.; MAEDA, K.; SASAKI, T.; WANG, Q. L; MORI N. T., SHIBATA, T.; IGUCHI, A. N., Epigallocatechin-3-gallate binding to MMP-2 inhibits gelatinolytic activity without influencing the attachment to extracellular matrix proteins but enhances MMP-2 binding to TIMP-2. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 415, n. 1, p. 126-32. 2003.

DEMEULE, M.; BROSSARD, M.; PAGE, M.; GINGRAS, D.;BELIVEAU, R., Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1478, n. 1, p. 51-60. 2000.

GARBISA, S.; SARTOR, L.; BIGGIN, S.; SALVATO, B.; BENELLI, R.; ALBINI, A., Tumor gelatinases and invasión inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. **Cancer**, New York, v. 91, p. 822-832. 2001.

GU, Z. M.; FANG, X. P.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L., 10-, 12-, and 29-hydroxybullatacinones: new cytotoxic Annonaceous. acetogenins from *Annona bullata* Rich (Annonaceae). **Natural Toxins**, New York, v. 2, p. 49-55. 1994.

HEILBRUN, L. K.;NOMURA, A.; STEMMERMANN, G. N., Black tea consumption and cancer risk: a prospective study. **British journal of cancer, Edinburgh**, v. 54, n. 4, p. 677-683. 1986.54, 677-683. 1986.

KERKELÄ, E; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Experimental dermatology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 109-25. 2003.

KIM, D. H.; SON, J. K.; WOO, M. H. Annomocherin, annonacin and annomontacin: a novel and two known bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. **Archives of pharmacal research**, Seoul, v. 24, n. 4, p. 300-306. 2001.

KIM, H. S.; KACEW, S.; LEE, B. M., In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentins edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). **Carcinogenesis**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 1637-40. 1999. 20, 1637-1640. 1999.

LAMBERT, J. D.; HONG, J.; YANGY, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **The American journal of clinical nutrition**, New York, n. 81, suppl. 1, p. 284S-291S. 2005.

LI, B. H.; ZHAO P.; LIU, S. Z.; YU, Y.M.; HAN, M.; WEN, J. K. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metallo-proteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis. **World journal of gastroenterology**: WJG, Beijing, v.11, n. 20, p. 3046-50. 2005.

LIAO, S.; UMEKITA Y.; GUO, J.; KOKONTIS, J. M.; HIIPAKKA, R. A. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 239-243. 1995.

- LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; LIN, C. Y.; CHOU, C. J.; CHIU, H.F.; WU, M. J.; WU, Y.C., New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of natural products**, Ohio, v. 65, n. 4, p. 470-75. 2002.
- LIU, M. J.; WANG, Z.; LI, H. X.; WU, R. C.; LIU, Y. Z.; WU, Q. Y. Mitochondrial dysfunction as an early event in the process of apoptosis induced by woodfordin I in human leukemia K562 cells. **Toxicology and applied pharmacology**, San Diego, v. 194, n. 2, p. 141-55. 2004.
- MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current opinion in cell biology**, London, v. 13, p. 534-540. 2001.
- MOOK, O. R.; FREDERIKS, W. M.; VAN NOORDEN, C. J. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. **Biochim Biophys Acta**. Amsterdam, v. 1705, n. 2, p. 69-89. 2004.
- PECERE, T.; GAZZOLA, M. V.; MUCIGNAT, C.; PAROLIN, C.; VECCHIA, F. D.; CAVAGGIONI, A.; BASSO, G.; DIASPRO A.; SALVATO, B.; CARLI, M.; PALU, G. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. **Cancer research**, Baltimore, v. 60, n.11, p. 2800-2804. 2000.
- PURICELLI, L.; DELL' AICA, I.; SARTOR, L.; GARBISA, S.; CANIATO, R.; Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloprotease MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P foetida* aqueous extracts. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, n. 3, p. 302-4. 2003.
- REYNOLDS, T.; DWECK, A. C. *Aloe vera* leaf gel: a review update. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 68, n.1-3, p. 3-37. 1999.
- SAMANTARAY, S.; SHARMA, R.; CHATTOPADHYAYA, T. K.; DATTA GUPTA, S.; RALHAN, R. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of cancer research and clinical oncology**, Berlin, n. 130, p. 37-44. 2004.
- SAZUKA, M.; IMAZAWA, H.; SHOJI, Y; MITA, T.; HARA, Y.; ISEMURA, M. Inhibition of collagenases from mouse lung carcinoma cells by green tea catechins and black tea theaflavins. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 9, p. 1504-6. 1997.
- SEO, U. K.; LEE, Y. J.; KIM, J. K.; CHA, B. Y.; KIM, D. W; NAM, K. S. ,KIM C. H. Large-scale and effective screening of Korean medicinal plants for inhibitory activity on matrix metalloproteinase-9. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 1 p. 101-6. 2005.
- SIDDIQUI, I. A.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; AHMAD, N; MUKHTAR, H. Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont. v. 6, n. 3, p. 571-82. 2004.
- TATE, P.; GOD, J.; BIBB, R.; LU, Q.; LARCOM, L. L. Inhibition of metalloproteinase activity by fruit extracts. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 212, n. 2, p. 153-58. 2004.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation research**, Baltimore, v. 92, p. 827-39. 2003.
- WALDEMARIN, K. C. A.; BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. **Real-Time Imaging**, London, v. 10, n.1, p. 197-204. 2004.
- WANG, L. Q.; MIN, B. S.; LI, Y.; NAKAMURA, N.; QIN, G. W., LI, C. .J.; HATTORI, M. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona Montana*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford. v. 10, n. 3, p. 561-5. 2002.

WASSERMAN, L.; AVIGAD, S.; BEERY, E.; NORDENBERG, J.; FENIG, E. The effect of aloe emodin on the proliferation of a new merkel carcinoma cell line. *The American Journal of dermatopathology*, New York, v. 24, n. 1, p. 17-22. 2002

WU, A. H.; YU, M. C.; SENG, C. C.; HANKIN, J.; PIKE M. C. Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, New York, v. 106, n. 4, p. 574-9. 2003.

ZHOU, H. E.; NOTHNICK, W. B. The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, Searington, v. 10, p. 569-75. 2005.