

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

BACHARELADO EM FARMÁCIA

MARIANA NOBRE FARIAS DE FRANÇA

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA*
SPP.SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA DE PULMÃO (LINHAGEM A549).**

SÃO CRISTÓVÃO

2018

MARIANA NOBRE FARIAS DE FRANÇA

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA*
SPP.SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA DE PULMÃO (LINHAGEM A549).**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Sergipe - UFS, como parte das exigências do Curso de Farmácia para obtenção do título de “Bacharel em Farmácia”.

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Scher

SÃO CRISTOVÃO

2018

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”
1 Coríntios capítulo 13 versículo2.

Dedico: Aos meus pais.

RESUMO

O câncer é a segunda doença classificada como doença e agravo e não transmissível que mais causa óbitos no mundo, chegando a representar 8,8 milhões de mortes por ano. Dos diferentes tipos de câncer que afetam a população o carcinoma de pulmão possui um dos piores prognósticos. Produtos naturais provenientes de plantas estão sendo amplamente estudados devido a sua atividade contra diversas enfermidades e dentre elas a atividade citotóxica e antiproliferativa sobre células cancerígenas. O gênero *Lippia* spp. é uma importante fonte de moléculas bioativas e foi alvo de estudo neste trabalho que teve como objetivo avaliar o potencial antiproliferativo das espécies de *Lippia alba* (genótipos 13 e 57), *Lippia gracilis* (genótipos 106 e 110) e *Lippia sidoides* (genótipos 102 e 104) em células de carcinoma de pulmão (linhagem A549). A atividade das espécies de *Lippia* sobre estas células foi avaliada através do método colorimétrico MTT. O tratamento das células com os óleos essenciais de *Lippia* e compostos majoritários reduziu a viabilidade das células de maneira dose dependente com IC₅₀ de 86,14 µg/mL (LA-13), 70,34 µg/mL (LA-57), 75,42 µg/mL (LG-106), 158,6 µg/mL (LG-110), 97,93 µg/mL (LS-102) e 150,70 µg/mL (LS-104). Os monoterpenos carvona (CC₅₀ 169,5 µg/mL), timol (CC₅₀ 88,25 µg/mL) e carvacrol (CC₅₀ 71,91 µg/mL) compostos majoritários dos óleos essenciais de LA-13 e LA-57, LG-106 e LS-102 e LG-110 e LS-104, respectivamente, sendo o composto carvacrol o mais citotóxico. O possível mecanismo envolvido na morte celular após tratamento com os óleos essenciais de LG-106 e LS-102 foi avaliado por microscopia usando o ensaio GIEMSA. As principais alterações morfológicas observadas sugerem morte celular por apoptose, pois, o estreitamento celular, condensação citoplasmática, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos foram observados em todos os tratamentos já a partir da menor concentração avaliada (0,5xIC₅₀). Os resultados de alteração morfológica obtidos pelo tratamento com LS-102 e LG-106 foram compatíveis com o tratamento com o fármaco de referência Doxorrubicina (5 µg/mL) que provocou alterações celulares como, condensação da cromatina, estreitamento celular e formação de corpos apoptóticos. Com isso, é possível afirmar que as espécies de *Lippia* avaliadas nesse trabalho são fonte promissora de compostos com atividade anticâncer, bem como, sugerir a morte celular por apoptose como mecanismo de morte celular.

Palavras-chave: *Lippia*, A549, citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is the second disease classified as a disease and injury and non-transmissible that causes more deaths in the world, reaching 8.8 million deaths per year. Of the different types of cancer that affect the lung carcinoma population has one of the worst prognoses. Natural products from plants are being widely studied due to their activity against various diseases and among them cytotoxic and antiproliferative activity on cancer cells. The genus *Lippia* spp. is an important source of bioactive molecules and was the object of study in this work that had as objective to evaluate the antiproliferative potential of the species of *Lippia alba* (genótipos 13 e 57), *Lippia gracilis* (genótipos 106 e 110) e *Lippia sidoides* (genótipos 102 e 104) em células de carcinoma de pulmão (linhagem A549). The activity of the *Lippia* species on these cells was evaluated by the colorimetric method MTT. Treatment of the cells with the essential oils of *Lippia* and major compounds reduced the viability of the cells reduced in an IC₅₀ dose-dependent manner of 86.14 µg/ml (LA-13), 70,34 µg/mL (LA-57), 75,42 µg/mL (LG-106), 158,6 µg/mL (LG-110), 97,93 µg/mL (LS-102) e 150,70 µg/mL (LS-104). The monoterpenes carvone (CC₅₀ 169.5 µg/mL), thymol (CC₅₀ 88.25 µg/mL) and carvacrol (CC₅₀ 71.91 µg/mL) major compounds of the essential oils of LA-13 and LA- 106 and LS-102 and LG-110 and LS-104, respectively, the carvacrol compound being the most cytotoxic. The possible mechanism involved in cell death after treatment with the essential oils of LG-106 and LS-102 was evaluated by microscopy using the GIEMSA assay. The main morphological alterations observed suggest cell death by apoptosis, since cellular narrowing, cytoplasmic condensation, chromatin condensation and formation of apoptotic bodies were observed in all treatments, starting from the lowest concentration evaluated (0,5xIC₅₀). The morphological alteration results obtained by the treatment with LS-102 and LG-106 were compatible with the treatment with the reference drug Doxorubicin (5 µg/mL) that caused cellular alterations such as, chromatin condensation, cell narrowing and formation of apoptotic bodies. With this, it is possible to affirm that the species of *Lippia* evaluated in this work are promising source of compounds with anticancer activity, as well as, to suggest cell death by apoptosis as mechanism of cell death.

Key-words: *Lippia*, A549, cytotoxicity.

LISTA DETABELAS

Tabela 1 - IC₅₀ dos óleos essenciais de *Lippiapp.* sobre células de carcinoma de pulmão (linhagem A549).

Tabela 2 - IC₅₀ dos terpenos sobre células de carcinoma de pulmão (linhagem A549).

Tabela 3 - Quantidade de células de carcinoma de pulmão (linhagem A549) com morfologia alterada após 24 horas de tratamento com os genótipos LG-106 e LS-102.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de oncogênese.

Figura 2 - Diagnóstico do adenocarcinoma (A) e carcinoma de células escamosas (B) obtidos através da observação histológica dos subtipos de CPCNP.

Figura 3 - Estrutura molecular da cisplatina e carboplatina.

Figura 4 - Viabilidade das células de carcinoma de pulmão (linhagem A549) expostas aos óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia*.

Figura 5 - Principais alterações morfológicas observadas em células de carcinoma de pulmão (linhagem A549) após 24 horas de tratamento com os óleos essenciais de LG-106 e LS-102.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Viabilidade das células de carcinoma de pulmão (linhagem A549) expostas aos óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* ssp.

LISTA DE ABREVIATURAS

CPCP - Carcinoma de Pulmão de Células Pequenas

CPCNP - Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - Dulbeccos's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácidos Desoxirribonucléicos
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF - Epidermal growth factor
EGFR- Epidermal growth factor receptor
g - Grama
HMG - *Hight Mobility Group*
IC₅₀-Concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular
FITC - Fluorescein Isothiocyanate Labeled
IARC - International Agency for Research on Cancer
INCA - Instituto Nacional do Câncer
MABs - *Monoclonal antibodies*
mg - Miligrama
min - Minutos
mL- Mililitro
mm – Milimetro
MTT - 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
nm – Nanometro
NSCLC - Non-small cell carcinoma
LA-13 - Genótipo 13 de Lippia alba
LA-57 - Genótipo 57 de Lippia alba
LS-102 - Genótipo 102 de Lippiasidoides
LS-104 - Genótipo 104 de Lippiasidoides
LG-106 - Genótipo 106 de Lippiagracilis
LG-110 - Genótipo 110 de Lippiagracilis
PBS - Phosphate-Buffered Saline
RENISUS - Relação Nominal de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
SIGMA - Empresa Sigma-Aldrich
SFB - Soro Fetal de Bovino
SUS – Sistema Único de Saúde
TKIs - Tyrosine-kinase inhibitor
TNM - Classification of Malignant Tumours
U - Unidade

μL – Microlitro

μg – Micrograma

mg - miligrama

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. Câncer	14
2.2. Câncer de pulmão, epidemiologia e tratamento	16
2.3. Produtos naturais e óleos essenciais	20
2.4. Gênero <i>Lippia</i> spp. e espécies <i>Lippia alba</i> , <i>Lippia gracilis</i> e <i>Lippia sidoides</i>	22
2.5. <i>Lippia alba</i>	23
2.6. <i>Lippia sidoides</i>	24
2.7. <i>Lippia gracilllis</i>	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Óleos essenciais	28
4.2. Linhagens e cultivo de células	28
4.3. Avaliação do potencial citotóxico dos óleos essenciais de <i>Lippia</i> spp. e terpenos	29
4.4. Análise morfológica - Coloração GIEMSA	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Avaliação do potencial citotóxico dos óleos essenciais de <i>Lippia</i> spp. e terpenos sobre células A549	32
5.2. Ensaio GIEMSA	33
6. DISCUÇÃO	37
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o termo utilizado para nomear um grupo de doenças classificadas como doença e agravo não transmissíveis com maior incidência no mundo, ficando atrás em número apenas das doenças cardiovasculares. Essa doença, que tem distribuição mundial, tem sua maior incidência nos países desenvolvidos (América do Norte, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia) e menores taxas nas regiões da África e Ásia. No Brasil, a estimativa para os anos 2018 e 2019 é da ocorrência de 600 mil novos casos de câncer em cada ano (INCA, 2018).

. Os cânceres de pulmão e de mama são os que causam mais mortes em homens e mulheres, respectivamente (TORRE et al. 2015). Além desses, outros tipos de câncer frequentemente diagnosticados são câncer de próstata, traqueia e brônquios e cólon e reto nos homens e, cólon e reto e colo uterino nas mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O carcinoma de pulmão além de estar entre os tipos de câncer que mais afetam a população é também uma das principais causas de morte com incidência que aumenta 2% ao ano (ALMEIDA et al. 2015), ocupando o segundo e quarto lugar entre os tipos de câncer com maior frequência em homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2018). Segundo o Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (2018) para o biênio 2018-2019, aqui no Brasil, a estimativa de incidência deste tipo de câncer para homens é de 18.740 casos e para as mulheres 12.530 casos.

Os principais tratamentos para o câncer são a radioterapia e quimioterapia e, além dessas técnicas ainda pode ser empregado o procedimento cirúrgico, ou a associação entre tratamentos (ARANHA, 2014). A quimioterapia caracteriza-se pela ação sistêmica de agentes antineoplásicos e estes têm como função eliminar células cancerosas do organismo. Entretanto, os antineoplásicos não têm capacidade de diferenciar células normais de células cancerosas e acabam por causar efeitos adversos aos pacientes (SCHEIN, 2006).

A radioterapia e cirurgia, diferentemente da quimioterapia, tem atividade local e consequências diferentes. A radioterapia, por exemplo, atua através da interação entre a radiação ionizante com moléculas vitais da célula, levando a morte ou impossibilitando a proliferação e, seus efeitos adversos dependem de diversos fatores, como, dose, tempo de exposição à radiação, local irradiado, além das condições clínicas do paciente (SILVA, 2016). A cirurgia por sua vez, tem finalidade diagnósticas, preventiva e curativa, e é caracterizada pela ressecção da massa tumoral e riscos associados a esse procedimento estão principalmente relacionados ao procedimento operacional (GUARISCH, RAMOS, 2001).

Considerando as limitações da terapia existente, como a quimiorresistência, efeitos colaterais e algumas vezes falta de efetividade no tratamento contra o câncer, diversas pesquisas envolvendo produtos naturais vegetais com compostos biologicamente ativos vem sendo realizadas. Muitos destes compostos possuem atividade estabelecida como, por exemplo, ação antibacteriana, antioxidante, antiinflamatória e dentre elas a atividade antitumoral e citotóxica (JÚNIOR, BOLZANI, BARREIRO, 2006). Os agentes bioativos apresentam-se então, como uma terapia alternativa às terapias convencionais existentes, podendo também diminuir a resistência aos quimioterápicos (SALEHI et al. 2018).

O Brasil possui uma diversidade vegetal muito grande sendo considerada a maior do mundo. Estima-se que existam de 350.000 a 550.000 espécies na flora brasileira, porém, apenas cerca de 55.000 estão catalogadas (MOREIRA, 2015). Essa diversidade é um importante estimulador do desenvolvimento sócio-econômico do país, tanto financeiramente quanto em termos de saúde devido às diversas enfermidades tratadas com produtos provenientes da flora (MOREIRA, 2015). Segundo Newman e Cragg (2016) um terço dos medicamentos é proveniente do reino vegetal e 77% dos medicamentos antineoplásicos são produzidos a partir de produtos naturais inalterados ou de seus derivados.

Dentre a variedade de plantas com propriedades biologicamente ativa estão às plantas do gênero *Lippia* spp. Esse gênero, que possui aproximadamente 200 espécies, está principalmente distribuído na América Central, regiões tropicais

da África, América do Norte e Sul e Austrália e têm como principais centros de diversidade o México e o Brasil. (SOARES e DIAS, 2013). Diversas plantas do gênero *Lippia* (Verbenaceae) apresentam propriedades medicinais como, por exemplo, atividade antibacteriana e antifúngica, atividade contra problemas respiratórios, gripe, bronquite, infecções cutâneas, atividade antiinflamatória, cicatrizante (SAMPAIO, 2009) e a atividade anticarcinogênica (RIBEIRO et al., 2012).

O câncer de pulmão é um dos tipos de câncer mais agressivos, e as dificuldades existentes no diagnóstico precoce dessa doença fazem com que a maioria dos casos de câncer de pulmão sejam descobertos já em estádios avançados. Além disso, apenas um terço dos pacientes pode passar por processo cirúrgico curativo, no qual é retirada a massa tumoral total, sendo que para a maioria dos casos é realizado apenas o tratamento paliativo com quimioterapia e/ou radioterapia (PALATO et al., 2013). Diante dessa realidade, se faz necessária a busca por terapias alternativas ou complementares às terapias antitumorais já existentes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer

O câncer surge a partir de uma alteração a nível celular que gera uma desordem proliferativa levando ao aparecimento do tumor. Essa doença causada por uma alteração genômica pode ser iniciada por diversos fatores ambientais, dentre eles, poluição e radiação, dietas ou ainda predisposição genética do indivíduo (ARANHA, 2014). Segundo o INCA (2014), uma grande porcentagem (80%) dos aparecimentos de cânceres na população está relacionada a fatores ambientais. Os casos de câncer de pulmão, por exemplo, têm como principal causa o tabagismo, chegando a representar 90% dos casos de câncer de pulmão (INCA, 2018).

As células do corpo humano estão programadas para se desenvolver, crescer, diferenciar e morrer, sendo que todos esses processos são rigorosamente regulados por substâncias como os fatores de crescimento e seus receptores, moléculas de transdução de sinal, fatores de transcrição nuclear, hormônios, e até mesmo codificações internas (JORDE et al., 2004). Os genes são as unidades responsáveis pelo equilíbrio desse processo, regulando as expressões e atividades da célula, bem como o funcionamento do organismo por possuírem toda a informação genética no DNA (INCA, 2014).

Existem três principais classes de genes envolvidos no processo de aparecimento do câncer, os genes supressores de tumor, os oncogenes, e os genes que participam do processo de reparo do DNA. Os genes supressores de tumor são os que têm função de inibir a proliferação celular de maneira desregulada, seja por interromper o ciclo celular, reduzir a expressão de uma proteína ou até mesmo levando a apoptose. O gene p53, por exemplo, é muito estudado no aparecimento do câncer por ser responsável pelo controle do ciclo celular e ativado quando há algum dano a célula (JORDE et al., 2004). Com a ativação desse gene em um processo de dano celular, podem ocorrer duas respostas, ativação do p21 que leva a parada do ciclo celular e processo de reparo do DNA, ou a indução da morte

celular programada (apoptose) por ativação de genes pró apoptóticos (KANAPATHIPILLAI, M., 2018). No processo de apoptose as alterações fisiológicas levam a remoção de células em processo de envelhecimento, células inutilizadas e células que sofreram dano irreparável ao DNA e podem apresentar perigo à homeostase (SANTARELLE et al., 2018). A apoptose caracteriza-se por algumas alterações morfológicas e bioquímicas da célula. Picnose (redução do volume celular), condensação da cromatina e fragmentação nuclear representam as principais alterações morfológicas ao passo que ativação das caspases e alterações na membrana celular para o reconhecimento das células fagocíticas, constituem as principais alterações bioquímicas (KOFF, RAMACHANDIRAN, BERNAL-MIZRACHI, 2015). Quando esses processos estão inativados, o que ocorre, por exemplo, no processo de mutação da p53, a célula perde a capacidade de reparo do DNA e também de entrar em processo de apoptose, levando ao aparecimento do câncer devido à proliferação celular descontrolada (JORDE, 2014).

Uma segunda causa do aparecimento de cânceres é a ativação de genes promotores de tumor, os chamados oncogenes. Os oncogenes são formas alteradas (mutadas) de genes de células normais conhecidos como proto-oncogenes, que tem como função o desenvolvimento e diferenciação celular (DODURGA, 2018). Esses proto-oncogenes estão geralmente envolvidos com os genes reguladores dos fatores de crescimento e de seus receptores, bem como de moléculas transdutoras e fatores de transcrição o que implica na proliferação e diferenciação descontrolada das células transformada e o aparecimento as neoplasias (JARDE, 2014).

Uma célula que sofreu mutação gênica passa por três estágios, iniciação, promoção e progressão até se tornar um tumor detectável clinicamente. Todo esse processo é chamado oncogênese ou carcinogênese e está detalhado na figura 1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O estágio de iniciação é caracterizado pela modificação gênica ocasionada pela ação de agentes cancerígenos sobre as células, o segundo estágio, chamado de promoção ocorre quando os genes oncopromotores são ativados transformando as células ainda normais em malignas e por último ocorre o estágio de progressão, na qual há proliferação desordenada e irreversível das células (ARANHA, 2014) formando os tumores.



Figura1. Processo de oncogênese. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (BRASIL). *Fisiopatologia do câncer*. 2 e., INCA, p 55-81, 2002.

As neoplasias podem apresentar-se de duas maneiras, benigna ou maligna, a depender do seu crescimento e organização. Tumores benignos tendem a ter sua localização restrita e delimitada como, por exemplo, lipoma, mioma e adenoma, entretanto essas massas tumorais podem comprimir regiões vizinhas. Já os tumores malignos como é o caso do câncer de pulmão possuem a capacidade de se disseminar para outros tecidos através da migração de células pela corrente sanguínea, são as chamadas metástases (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). As metaloproteínas estão diretamente relacionadas a essa problemática, pois são essas enzimas as responsáveis pela degradação da matriz extracelular e seus componentes colágenos e elastina que permitem o processo invasivo desta neoplasia (ZANG et al. 2014).

2.2. Câncer de pulmão, epidemiologia e tratamento

O câncer de pulmão pode ser classificado histopatologicamente de duas formas: carcinoma de células pequenas (CPCP) e carcinoma de células não pequenas (CPCNP). Incluídos no segundo grupo, carcinoma de células não pequenas, de acordo com a classificação imuno-histoquímica e morfológica, estão o

adenocarcinoma, o carcinoma de células grandes e de células escamosas (DAWARD et al. 2017).

O carcinoma de células não pequenas é o tipo mais comum dentre os tipos de câncer de pulmão com 80 a 85% de prevalência. Já o carcinoma de células pequenas representa os outros 20 a 15% dos casos desse tipo de câncer. Dentre os subtipos do carcinoma de células não pequenas, o adenocarcinoma possui cerca de 40% de prevalência, seguido por carcinoma de células escamosas com 25 a 30% e, carcinomas de células grandes com 10 a 15% dos casos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). Um dado importante sobre o câncer de células escamosas é que o prognóstico ruim estabelece uma expectativa de apenas 5 anos de vida em pacientes recém diagnosticados (SANTARELLE et al., 2018).

A metástase e a característica invasora dos cânceres de pulmão são responsáveis pelo grande número de óbitos decorrentes dessa doença em pacientes em estágio avançado (ZANG et al., 2014). A última estimativa mundial realizada em 2012, pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) revelou que o número de óbitos decorrentes do câncer de pulmão foi de 1,6 milhões (FERLAY, 2015). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, foram 15.514 óbitos para homens e 10.978 óbitos para mulheres no ano 2015 (INCA, 2018).

A classificação histopatológica e o estadiamento do câncer de pulmão são importantes no tratamento dessa doença (MILLER et al., 2016). O estadiamento classifica os tumores quanto à taxa de crescimento, extensão e relação tumor-paciente e, para os tumores malignos, como os cânceres de pulmão, o estadiamento é avaliado através do grau de disseminação. A União Internacional Contra o Câncer classifica os tumores malignos através do sistema TNM que avalia as características do tumor primário (T), os linfonodos da cadeia linfática do órgão onde o tumor está localizado (N) e a presença ou não de metástase à distância (M) através de exames clínicos e de imagem. (INCA, 2018).

Os quatro tipos mais frequentes de carcinoma de pulmão são os classificados imuno-histoquimicamente em carcinoma de células pequenas (CPCP), carcinoma de células grandes, adenocarcinoma e espinocelular (escamoso), esses

três últimos estão associados no grupo carcinoma de células não pequenas (CPCNP). Essa classificação permite identificar a característica celular e molecular do tumor, diferenciando-os e determinando além do tratamento, o provável prognóstico (WEAVER, COONAR, 2017). A figura 2 mostra a diferença histológica de dois subtipos de CPCNP, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas, através da diferenciação glandular e citoqueratinização presente em cada uma, respectivamente (OSMANI et al., 2017).

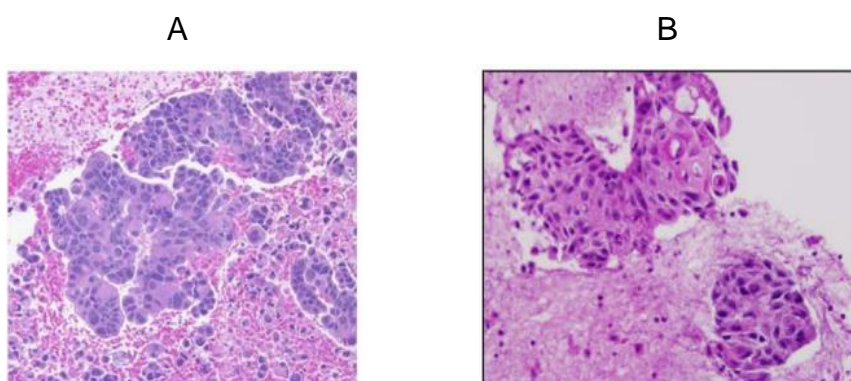


Figura 2. Diagnóstico do adenocarcinoma (A) e carcinoma de células escamosas (B) obtidos através da observação histológica dos subtipos de CPCNP.Fonte: Current WHO guidelines and critical role of immunohistochemical markers in the subclassification on non-small cell carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy.

Quando se trata do carcinoma de células pequenas a cirurgia não é recomendada, entretanto a radioterapia torácica e craniana (profilaxia) aumenta a sobrevida dos pacientes. A quimioterapia, neste caso, é preferível, e o principal esquema terapêutico está voltado a drogas derivadas da platina, como, cisplatinae carboplatina(figura 3) e o etoposido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).



Figura 3. Estrutura molecular da cisplatina e carboplatina. Fonte: Compostos de platina em quimioterapia do câncer.

Os compostos derivados da platina, como a cisplatina,vêm sendo muito estudados devido a sua capacidade de interação com o DNA celular que acarreta

em dano a nível molecular, responsável pela atividade citotóxica (FONTES, ALMEIDA, NADER, 1997). Adutos monofuncionais e bifuncionais formados a partir da interação entre cisplatina e átomos das bases nitrogenadas do DNA, levam a desenovelamento e modificação na estrutura do DNA, iniciando o processo apoptótico e necrótico das células tumorais. Outro fator resultante desta interação é o reconhecimento da modificação do DNA por parte das proteínas *Hight Mobility Group* (HMG) que podem ser retiradas do seu sítio de ação levando ao mau funcionamento celular ou podem ainda proteger o DNA danificado do processo de reparo (NEVES, VARGAS, 2011).

Outros fármacos derivados da platina como a carboplatina e oxaliplatina, comercializados no Brasil, possuem algumas características distintas da cisplatina. Por exemplo, a carboplatina, fármaco de segunda geração, é menos reativa e mais facilmente excretada do organismo, o que diminui sua toxicidade. Entretanto, a carboplatina tem sua atividade diminuída em alguns tipos de câncer como os de bexiga e pescoço. Já a oxaliplatina além de ser usada para tratamento de cânceres resistentes a cisplatina tem como principal característica a ausência de nefrotoxicidade uma vez que seus metabólitos não se acumulam no plasma. (NEVES, VARGAS, 2011).

Apesar dos efeitos colaterais encontrados no tratamento com a cisplatina, nefrotoxicidade (se usadas altas concentrações), ototoxicidade, toxicidade gastrointestinal e neurotoxicidade (FONTES, ALMEIDA, 1997), atualmente, a cisplatina é utilizada em 60% dos tratamentos contra diversos tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão.

Ao contrário do CPCP, para os casos de carcinoma de células não pequenas (CPCNP) em estágio I e II a cirurgia representa a melhor escolha para os pacientes (69%), e para 25% destes o procedimento é associado à quimioterapia e/ou radioterapia. Na quimioterapia podem ser usados para o tratamento do CPCNP os fármacos inibidores da angiogênese (MILLER et al., 2016) uma vez que este processo está diretamente relacionado não somente ao desenvolvimento, mas também a disseminação de tumores, pois a angiogênese permite a mobilidade

celular, proteólise tecidual e proliferação celular através da formação de novos vasos capilares(SILVA et al. 2007).

Os medicamentos bevacizumabe, sorafenibee sunitinibe são exemplos de inibidores da angiogênese, por impedirem a via de sinalização vascular e/ou inibirem a tirosina-quinase. O medicamento bevacizumabe mostrou bons resultados para o tratamento de cânceres de tecidos duros em associação a quimioterapia, por exemplo, em câncer de pulmão metastático (PENG et al. 2018). Os principais efeitos colaterais do tratamento com as medicações inibidoras da angiogênese são os problemas relacionados à hipertensão arterial, *rash* cutâneo e complicações oftálmicas (SOUZA et al., 2015).

Os fármacos inibidores do fator de crescimento epidérmico(EGF)também podem ser usados na quimioterapia para CPCNP (MILLER et al., 2016), pois, estes fatores de crescimento medeiam processos de proliferação, diferenciação, adesão e migração das células epiteliais, quese encontram desregulados no câncer. Anormalidades nesse processo foram encontradas, por exemplo,nos cânceres de pulmão, mama e ovário. Os medicamentos que tem essa função de inibição são os anticorpos monoclonais (MABs) e inibidores da tirosina quinase (TKIs) (LEITE et al., 2012). O cetuximabe, por exemplo, é um anticorpo monoclonal que compete com o EGF pelos receptores de membrana do fator de crescimento (EGFR) impedindo a interação e conseqüentemente às respostas celulares decorrentes dessa ligação.

2.3. Produtos naturais e óleos essenciais

As plantas medicinais são fonte de produtos naturais biologicamente ativos,eseu uso pela população tem aumentado significativamente ao longo dos anos(MACEDO, 2016). Essas plantas são de grande importância para a pesquisa e desenvolvimento de substâncias farmacológicas, seja de forma direta quando seus constituintes são usados como princípio ativo, ou de forma indireta na utilização dos constituintes da planta para a síntese do princípio ativo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, dentro da prática da medicina tradicional de países desenvolvidos, 85% fazem uso de plantas medicinais (MACEDO, 2016). Pesquisas mostram que das 1.562 novas drogas aprovadas para comercialização entre os anos 1981 e 2014, uma porcentagem de 33% é derivada de produtos naturais, seja um produto natural inalterado, uma droga botânica com mistura definida ou um derivado de produto natural (NEWMAN E CRAGG, 2016).

No Brasil, o uso de plantas medicinais cresce e se torna cada vez mais relevante no tratamento de enfermidades. Em 2009, o Ministério da Saúde divulgou a lista de plantas medicinais que podem ser usadas no Sistema Único de Saúde (SUS) na Relação Nominal de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) que tem como objetivo orientar as pesquisas com plantas (ARAÚJO et al. 2014). A RENISUS hoje é composta por 71 plantas medicinais com diversas propriedades e indicações terapêuticas e, em meio a essas plantas com propriedades biológicas comprovada está a *Lippia sidoides*, popularmente conhecida como alecrim-pimenta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Um produto natural que pode ser obtido a partir das plantas medicinais é o óleo essencial. Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas e estão relacionados com diversas funções de sobrevivência destas, como, por exemplo, na defesa contra microorganismos. Na prática medicinal, sua atividade vem sendo documentada há muitos anos principalmente devido a sua ação antimicrobiana e, está cientificamente comprovado que cerca de 65% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% antibacterianas (LOBO et al., 2015).

O emprego dos óleos essenciais se dá nas mais diversas áreas e para as mais diferentes funções. Na área da saúde, por exemplo, a sua utilização pode ser efetiva em procedimentos como no tratamento da regulação hormonal ou em condições odontológicas, como no tratamento de infecções microbianas, na qual podem ser citadas para estes casos a *Illicium verum* e a *Lippia sidoides*, respectivamente (LOBO et al., 2015; ALMEIDA et al., 2015). Existem ainda óleos

essenciais cuja atividade contra doenças graves vem sendo comprovada, é o caso da citotoxicidade contra células tumorais. Algumas espécies já foram descritas como detentoras de constituintes com propriedade antiproliferativa e citotóxica. Neste caso, pode ser citada a espécie *Lippia alba* que possui atividade citotóxica contra células HeLa (câncer de colo uterino) e ainda a espécie *Amomum tsaoko* com atividade comprovada sobre várias linhagens de células tumorais, incluindo HepG2 (hepatocarcinoma) e HeLa (YANG et al., 2010).

2.4. Gênero *Lippia* spp. e espécies *Lippia alba*, *Lippia gracilis* e *Lippia sidoides*

O gênero *Lippia*spp. (Verbenaceae) é composto por cerca de 200 espécies de arbustos, ervas e plantas de pequeno e grande porte que estão distribuídas principalmente em regiões tropicais (SOARES, TAVARES-DIAS, 2013). Regiões áridas dos Estados Unidos, florestas tropicais da América central e o cerrado brasileiro são locais endêmicos desse gênero que se estende ainda pelo Uruguai e Argentina. Algumas espécies de *Lippia* se desenvolvem também em regiões tropicais da África e na Austrália (SALIMENA, 2010). O Brasil é um dos principais centros de diversidade de espécies de *Lippia*, juntamente com o México, contando com cerca de 120 espécies distribuídas na caatinga e serrado do país (SOARES, TAVARES-DIAS, 2013). Essa rica diversidade é um importante estimulador e facilitador das pesquisas com *Lippia* e seus derivados naturais.

Muitas propriedades biológicas e medicinais são atribuídas às espécies de plantado gênero *Lippia*. Pascual e colaboradores afirmam que as principais indicações de uso dessas espécies estão voltadas para o tratamento de condições gastrointestinais e respiratórias (PASCUAL et al., 2001). Sua atividade também está descrita na literatura para o tratamento da hipertensão arterial (HENNEBELLE et al., 2008), infecções microbianas (PASCUAL et al, 2001) e modulador de processos inflamatório (LÓPEZ et al., 2016). Outros exemplos de aplicações das espécies do gênero *Lippia* são o tratamento da febre, malária, e o uso como repelente de insetos (MAROYI, 2017) e atividade contra larvas de *Aedes aegypti* (SIMÕES et al., 2015).

Uma pesquisa realizada em 2016 mostrou ainda que algumas espécies desse gênero (*Lippia sidoides*, *Lippia alba*, *Lippia gracillis* e *Lippia pedunculosa*) possuem atividade amebicida com resultados de IC₅₀ 40 µg/mL para *Lippia sidoides* e *Lippia gracillis*, sendo que estas foram capazes de apresentar efeito inibitório de 100% sobre o crescimento de *Acanthamoeba polyphaga*, trofozoíto responsável pela amebíase (SANTOS et al., 2016).

As atividades biológicas apresentadas pelas espécies de *Lippias* e dão principalmente pelos componentes majoritários que as constituem. Timol e carvacrol, por exemplo, são monoterpenos componentes majoritários de algumas espécies do gênero *Lippia*, que conferem atividade antimicrobiana a estas (ALMEIDA, 2016). Outro exemplo de composto majoritário de planta do gênero *Lippia* que possui atividade biológica ativa é o linalol responsável pela propriedade antiinflamatória das plantas (CAMARGO, VASCONCELOS, 2014).

2.5. *Lippia alba*

Lippia alba (MILL.) N. E. Browné uma espécie conhecida popularmente como erva-cidreira (PORFÍRIO et al., 2017). Essa planta, encontrada principalmente na América do Sul, apresenta uma grande variedade química e diversas propriedades terapêuticas comprovadas (ALMEIDA, 2016). *L. alba* tem como principais constituintes os monoterpenos carvona, limoneno, citral, neral egeranial, entretanto, a sua real composição química está dividida em quimiotipos que dependem de mudanças climáticas de cada região (HENNEBELLE et al., 2006).

Na medicina popular o uso da *L. alba* está voltado principalmente para o tratamento de transtornos gastrointestinais, doenças respiratórias e problemas hepáticos (CAMILLO, 2016). No México, o seu uso é descrito pela população para o tratamento de inflamações da vesícula biliar, (BLANCO et al., 2013) espasmos e também para problemas relacionados ao fluxo gastrointestinal (HENNEBELLE et al. 2008). Pascual et al. (2001) em uma pesquisa sobre o uso da *L. alba*, afirmaram que esta espécie é uma das mais estudadas do gênero quanto as suas propriedades farmacológicas e citam algumas de suas atividades como a capacidade analgésica,

citoestática e anticonvulsivante. A atividade antifúngica do composto citral, constituinte químico do óleo essencial de *L. alba*, também está descrito na literatura contra *Aspergillus fumigatus*, *Candida krusei* (ARANGO et al. 2009), *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsolosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum* e *Fonseca eapedrosoi* (OLIVEIRA et al. 2006)

Em relação à atividade antitumoral do óleo essencial de *Lippia alba* e seus componentes majoritários, a literatura mostra que essa espécie possui atividade citotóxica contra algumas linhagens de células. Arango et al. (2009) realizaram um estudo para avaliar a atividade citotóxica de *L. alba* sobre células HeLa, linhagem de células tumorais do câncer do colo uterino, e obtiveram como resultado uma CC_{50} igual a 3,5 $\mu\text{g/mL}$. Esse mesmo estudo mostrou o potencial citotóxico da *L. alba* sobre células não tumorais e constatou que é necessária uma concentração quase 29 vezes maior para que este seja citotóxico as células saudáveis do rim de macaco. Outro estudo com linhagens tumorais K-562 (Leucemia mielóide crônica) e HL-60 (Leucemia mielóide aguda), mostrou que os constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia alba* são capazes de aumentar a expressão da proteína Bax, bem como a liberação do citocromo C mitocondrial e caspases 9 e 3 sugerindo que o óleo é capaz de levar a morte celular por apoptose. (JI et al. 2006).

2.6. *Lippiasidoïdes*

A espécie *Lippia sidoides* Cham, nativa das regiões nordeste e sudeste (norte de Minas Gerais) do Brasil, é conhecida popularmente como alecrim-pimenta (MORAES et al. 2016). Sua composição química é rica em monoterpenos como timol, carvacrol, 1,8 cineol, isoborneol e acetato de bornila (MORAES et al., 2012), sendo esta composição química responsável por diversas atividades terapêuticas atribuídas ao óleo essencial.

A propriedade antimicrobiana do óleo essencial de *L. sidoides* foi descrita por Botelho e colaboradores (2007) contra algumas espécies de fungos e bactérias

sendo o fungo *Candida albicans* e a bactéria *Streptococcus mutans* mais sensíveis. Moraes et al. (2016) realizaram estudos que demonstraram a atividade antifúngica dessa espécie também contra *Cryptococcus* sp. Estes autores investigaram também a atividade antiinflamatória e antinociceptiva (*in vivo*) de *L. sidoides* mostrando que esta é capaz de reduzir a atividade inflamatória, não possuindo, porém, atividade analgésica central. A atividade larvicida contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* (CARVALHO et al. 2003) e acaricida (CAVALCANTI et al. 2010) de *L. sidoides* também foi comprovada.

Em uma pesquisa sobre a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Lippia sidoides* e de seus componentes majoritários, timol e carvacrol, foi observado que os genótipos 102 e 104 dessa espécie foram capazes de inibir o crescimento dos parasitas de *Leishmania chagasi*, responsáveis pelo surgimento da doença leishmaniose (JÚNIOR et al. 2012). A atividade antitumoral do óleo essencial de *Lippia sidoides* foi avaliada por Gomide e colaboradores em linhagem celular tumoral do carcinoma de cólon mostrando que essa espécie possui potencial citotóxico contra células do câncer (GOMIDE et al. 2013).

2.7. *Lippia gracilis*

Lippia gracilis Schauer é encontrada em regiões do nordeste brasileiro com características semi-áridas. Tem como principais monoterpenos o timol e carvacrol, (COSTA-JÚNIOR et al., 2016), γ -terpineno e β -cariofileno (MENDES et al., 2010). Conhecida popularmente como alecrim-da-chapada esta espécie possui diversas atividades biológicas comprovadas e seu uso pela população é bastante conhecido (MENDES et al., 2010).

Dentre as atividades descritas na literatura atribuídas ao óleo essencial de *Lippia gracilis* e seus constituintes químicos está à atividade amebicida contra *Acanthamoeba polyohaga*, sendo o óleo capaz de eliminar até 100% dos parasitas que causam a amebíase (SANTOS et al., 2016). Outras atividades como capacidade analgésica e antiinflamatória (MENDES et al. 2010), tratamento de úlcera, feridas e

queimaduras (PASCUAL et al., 2001) e atividade antidermatofílica e leishmanicida (MELO et al., 2013) também foram relatadas. Um estudo realizado com três genótipos de *Lippia gracilis* mostrou que essa espécie possui atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais, câncer de colo uterino (HeLa), melanoma (B16) e câncer de mama (MCF-7) (MELO et al. 2014).

Diversos estudos mostram as atividades que as plantas do gênero *Lippia* spp. possuem, especificando o seu uso medicinal contra muitas enfermidades. As espécies *Lippia alba*, *Lippia gracilis* e *Lippia sidoides* são exemplos de plantas desse gênero que têm como característica, por exemplo, a atividade citotóxica sobre microorganismos e sobre algumas linhagens de células tumorais. Esse potencial citotóxico apresentado por estas espécies tornam-nas promissoras na pesquisa contra o câncer, sendo essa propriedade atribuída principalmente à composição majoritária dos seus óleos essenciais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade citotóxica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *L. alba* e *L. gracilis* em linhagem de células de carcinoma de pulmão.

3.2. Objetivos específicos

Determinar a CC₅₀ dos óleos essenciais de diferentes genótipos de *Lippiasidoides*, *L. alba* e *L. gracilis* sobre células de carcinoma de pulmão (linhagem A549).

Avaliar as alterações morfológicas sofridas pelas células expostas aos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Lippia gracilis* através de método colorimétrico.

Determinar a CC₅₀ dos terpenos timol, carvacrol e carvona sobre células de carcinoma de pulmão (linhagem A549).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Lippia alba*, genótipos 13 e 57(LA-13 e LA-57), *Lippiasidooides*, genótipos 102 e 104 (LS-102 e LS-104) e *Lippia gracilis*, genótipos 106 e 110 (LG-106 e LG-110) foram obtidos por processo de hidrodestilação e cedidos pelo Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank do Departamento de Agronomia da Universidade Federal de Sergipe. Os terpenos carvacrol (99,9%) (nome IUPAC: 2-methyl-5-propan-2-ylphenol), (-) - carvona (99,4%) (nome IUPAC: (5R)-2-methyl-5-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-one) e timol (99,0%) (nome IUPAC: 5-methyl-2-propan-2-ylphenol) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Para a realização dos experimentos de citotoxicidade uma solução estoque a 160 mg/mL foi preparada a partir da diluição de 0,016 g de óleo essencial ou do terpeno a ser avaliado, em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Essa solução estoque foi utilizada para a preparação de uma solução de trabalho (160 µg/mL) que foi obtida a partir da diluição de 5 µL da solução estoque em 5 mL de meio DMEM completo (10% de SFB e 1% de antibiótico). A solução de trabalho foi usada para a preparação das demais concentrações (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 µg/mL).

4.2. Linhagens e cultivo de células

As células de carcinoma de pulmão (linhagem A549) foram cultivadas no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Morfologia em garrafas de poliestireno contendo meio Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (10000 U/mL de penicilina e 10000 mg/mL de estreptomicina) (Sigma-Aldrich). O meio DMEM completo foi substituído por um meio novo contendo nutrientes a cada 48 horas, durante o período de manutenção.

As células foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C até apresentarem confluência suficiente para a realização dos experimentos de citotoxicidade. Para a realização dos experimentos as células, que têm característica de aderência, foram submetidas ao processo de tripsinização através de uma solução contendo EDTA 0,25%, um quelante de cálcio, para o desprendimento das mesmas da garrafa.

4.3. Avaliação do potencial citotóxico dos óleos essenciais de *Lippia* spp. e terpenos.

O ensaio colorimétrico MTT foi realizado para avaliar o potencial citotóxico dos óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* spp e de seus compostos majoritários, timol, carvacrol e carvona. Este ensaio que é amplamente utilizado na avaliação da viabilidade celular é também utilizado para avaliação da redução da atividade enzimática, isto por que, são as enzimas desidrogenases mitocondriais de células viáveis que catalisam a redução do sal MTT a formazan (CHACON, ACOSTA, LEMASTERS, 1997), composto que será quantificado ao final do experimento.

Neste experimento, as células da linhagem A549 (câncer de pulmão) foram semeadas em placas de cultivo de célula de 96 poços com fundo chato na concentração de 1×10^4 células/poço em meio DMEM completo (10% de SFB e 1% de antibiótico). As células foram incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C para aderência e após esse tempo, as células foram expostas a concentrações crescentes (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 µg/mL) dos óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* e dos terpenos, por 24 horas em estufa sob mesmas condições. Além dos tratamentos com os óleos essenciais de cada espécie (*Lippia alba*, *Lippia sidoides* e *Lippia gracilis*) e compostos majoritários isolados (timol, carvacrol e carvona), os controles negativos contendo apenas células e meio de cultura (DMEM completo), células em meio DMEM completo contendo 0,1% de DMSO (concentração máxima utilizada na diluição dos óleos essenciais e monoterpenos) e controle positivo contendo doxorrubicina, foram realizados.

Após 24 horas os meios dos poços contendo os tratamentos e os controles, foram substituídos por 200 µL do sal MTT (brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5-difeniltetrazólio)) dissolvido em PBS em concentração de 5 mg/mL. Depois de três horas o MTT foi substituído por 200µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan gerados pela ação das enzimas desidrogenases e o acúmulo de formazan foi medido em espectrofotometria com comprimento de onda igual a 570 nm. O cálculo de viabilidade foi realizado a partir da fórmula:

$$\% \text{Viabilidade celular} = \frac{\text{Abs. (tratamentos)} - \text{Abs. (branco)}}{\text{Abs. (controle negativo)} - \text{Abs. (branco)}} \times 100$$

4.4. Análise morfológica

As células de câncer de pulmão (linhagens A549) foram semeadas em placas de 24 poços, previamente preparadas com lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro (Knittel glass), esterilizadas por radiação UV por 40 minutos, em meio DMEM completo (10% de SFB e 1% de antibiótico) na concentração de 5×10^4 células/poço.

As células foram mantidas por 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C para aderência. Em seguida, foram submetidas aos tratamentos com óleos essenciais de *Lippia sidoides* (LS-102) e *Lippia gracilis* (LG-106) nas concentrações referentes a 0,5 x CC₅₀, 1 x CC₅₀ e 1,5 x CC₅₀, pré-determinadas no ensaio MTT, por 12 e 24 horas. Células sem tratamento, crescidas apenas em meio DMEM completo, foram usadas como controle de viabilidade 100%.

Ao completar de 24 horas os meios contendo os tratamentos e o meio do controle negativo foram descartados e as lamínulas contendo as células em sua superfície foram retiradas dos poços, fixadas por 3 minutos em metanol e coradas com GIEMSA. A coloração GIEMSA tem característica policromática por conseguir originar diferenças mínimas na cor do material que está sendo submetido ao processo de coloração. Isso se dá por este se tratar de um composto neutro

contendo corantes azur II e eosinato de azur II (BRAMMER, TONIAZZO, POERSCH, 2015). Após coloração as lamínulas foram montadas em lâminas para microscopia e analisadas em microscópio ótico (OLYMPUS CX 30) com aumento de 400 vezes para identificação das alterações morfológicas geradas pelos óleos essenciais sobre as células. Cerca de 150 células em aproximadamente 5 campos aleatórios foram analisadas e classificadas em: sem morfologia alterada ou com morfologia alterada. A contagem de células foi realizada as cegas.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do potencial citotóxico dos óleos essenciais de *Lippia* spp. e terpenos em células A549

Com a realização do ensaio colorimétrico MTT, foi possível determinar o efeito dos óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* spp. sobre a viabilidade das células de carcinoma de pulmão, linhagem A549. Como mostra a figura 4 (A, B e C), as espécies *Lippia alba*, *Lippia gracilis* e *Lippia sidoides* foram capazes de reduzir a viabilidade das células após 24 horas de exposição ao óleo de modo dose dependente. É possível observar também que os genótipos 102 de *L. sidoides* (LS-102), 106 de *L. gracilis* (LG-106) e 57 de *L. alba* (LA-57) mostraram-se ligeiramente mais citotóxicos que os genótipos LS-104, LG-110 e LA-13.

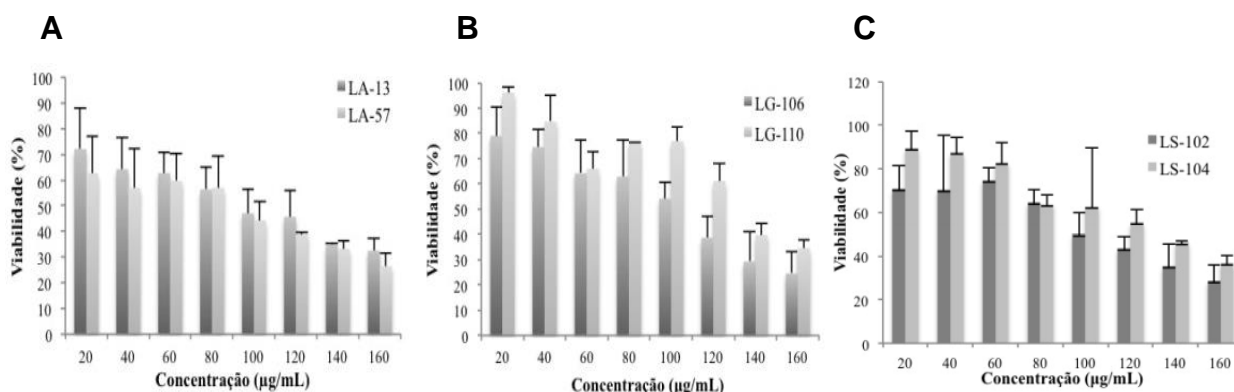


Figura 4. Viabilidade das células de carcinoma de pulmão (linhagem A549) expostas aos óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* nas concentrações crescentes 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 µg/mL, por 24 horas. A: *Lippia alba* genótipos 13 e 57, B: *Lippia gracilis* genótipos 106 e 110 e A: *Lippia sidoides* genótipos 102 e 104. Resultados apresentados em média (intervalo de confiança a 95%) e desvio padrão.

A CC_{50} dos óleos essenciais de *L. alba*, *L. gracilis* e *L. sidoides* estão apresentadas na tabela 1 juntamente com seus respectivos componentes majoritários. Os genótipos que apresentaram menores CC_{50} ($CC_{50}=70,34$ µg/mL e $75,42$ µg/mL) foram LA-57 e LG-106, respectivamente, seguidos dos genótipos LA-13 e LS-102 ($CC_{50}=86,14$ µg/mL e $97,93$ µg/mL, respectivamente). Os óleos ricos em carvona apresentaram menor citotoxicidade sobre células da linhagem A549, com CC_{50} iguais a $158,6$ µg/mL (LG-110) e $150,70$ µg/mL (LS-104).

Tabela 1. CC₅₀ dos óleos essenciais de *Lippia* spp. sobre células de carcinoma de pulmão (linhagem A549).

Espécie	Genótipo	Componente Majoritário	CC ₅₀ (µg/mL) *
<i>Lippia alba</i>	LA-13	Carvona	86,14 (72,3 – 102,6)
	LA-57	Carvona	70,34 (57,8 - 85,7)
<i>Lippia gracilis</i>	LG-106	Timol	75,42 (62,3 – 91,3)
	LG-110	Carvacrol	158,6 (121,0 – 207,9)
<i>Lippia sidoides</i>	LS-102	Timol	97,93 (75,68 – 126,7)
	LS-104	Carvacrol	150,70 (117,8 – 192,9)

*Valores expressos em média de três experimentos independentes com intervalo de confiança de 95%.

Os ensaios de MTT realizados com os compostos majoritários dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia gracilis* e *Lippia sidoides* sobre células de carcinoma de pulmão tratadas por 24 horas (tabela 2), mostraram que o terpeno com maior potencial citotóxico e menor CC₅₀ é o carvacrol, encontrado em maiores proporções nos óleos essenciais de *Lippia gracilis* LG-110e *L. sidoides* LS-104. O terpeno que apresentou a segunda menor CC₅₀ foi o terpeno timol encontrado nos óleos essenciais de *Lippia gracilis* LG-106e *L. sidoides* 102.

Tabela 2. CC₅₀ dos monoterpenos majoritários sobre células de carcinoma de pulmão (linhagem A549)

Monoterpeno	CC ₅₀ (µg/mL)*
Carvacrol	71,91 (63,77 – 80,05)
Carvona	169,5 (132,1 – 201,0)
Timol	88,25 (81,27 – 95,23)

*Valores expressos em média de três experimentos independentes com intervalo de confiança de 95%.

5.2. Ensaio GIEMSA

As alterações morfológicas presentes nas células de carcinoma de pulmão (linhagem A549), após 24 horas de exposição aos óleos essenciais de *Lippia gracilis* LG-106 e *Lippia sidoides* LG-102 foram avaliadas através do método colorimétrico GIEMSA. Estes genótipos foram selecionados devido à capacidade citotóxica contra células A549, bem como pela composição química que contém o

timol, monoterpene citotóxico a estas células, como componente majoritário e a falta de registro na literatura com pesquisa que relacione a LG-106 e LS-102 ao carcinoma de pulmão. Dentre as mudanças nas características celulares (figura 5) após os tratamentos, foi possível observar principalmente a condensação citoplasmática, condensação da cromatina em regiões periféricas do núcleo e formação de corpos apoptóticos. Foi possível observar ainda que os óleos essenciais de LG-106 e LS-102 reduziram o contato entre células, isso possivelmente devido ao estreitamento celular e diminuição da proliferação. A doxorrubicina, fármaco utilizado como controle positivo, foi capaz de provocar alterações morfológicas características de apoptose em concentração igual a 5 $\mu\text{g/mL}$.

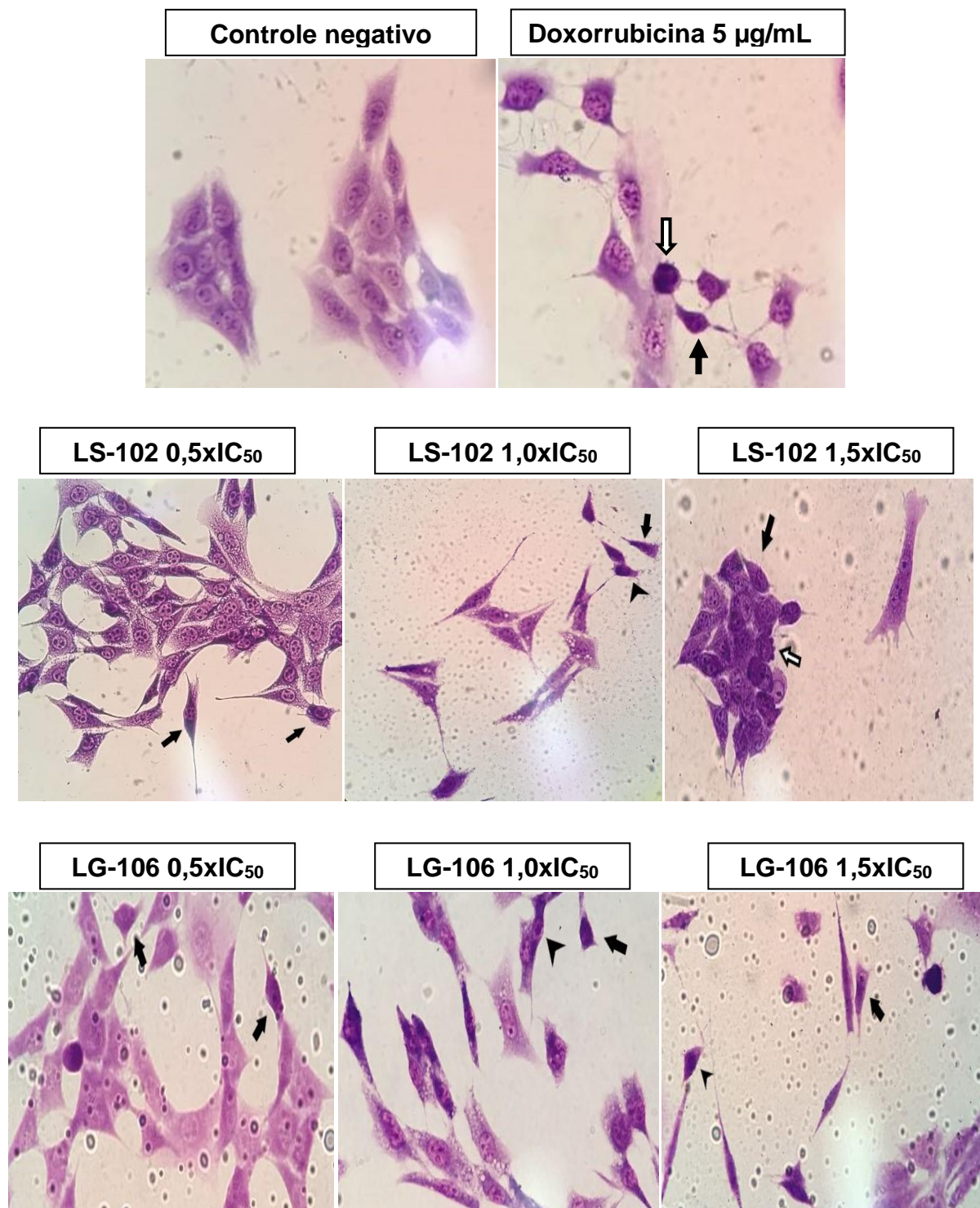


Figura 5. Principais alterações morfológicas observadas em células de carcinoma de pulmão (linhagem A549) após 24 horas de tratamento com os óleos essenciais de LG-106 e LS-102, nas concentrações referentes a 0,5x CC_{50} , 1x CC_{50} e 1,5x CC_{50} . Controle negativo. \blackrightarrow Condensação citoplasmática; \Rightarrow formação de corpos apoptóticos; \blacktriangleright condensação da cromatina.

Na tabela 3 foi possível observar que os genótipos LG-106 e LS-102 foram capazes de gerar alterações morfológicas em mais de 50% das células já a partir da menor concentração avaliada que corresponde a metade da CC_{50} de cada

óleo. A principal mudança morfológica presente nas células tratadas com os óleos foi a condensação citoplasmática, presente em todas os tratamentos.

Tabela 3. Quantificação de células de carcinoma de pulmão (linhagem A549) com morfologia alterada e inalterada após 24 horas de tratamento com os genótipos LG-106 e LS-102 nas três concentrações referentes a 0,5xCC₅₀, 1xCC₅₀ e 1,5xCC₅₀.

Tratamento	Concentração	Células morfológicamente inalteradas (%)	Células morfológicamente alteradas (%)
Controle negativo	-	91,1	8,9
Doxorrubicina	5 µg/mL	8,5	91,5
<i>Lippia gracilis</i> (LG-106)	0,5xCC ₅₀	35,3	74,7
	1xCC ₅₀	13,7	86,3
	1,5xCC ₅₀	23,2	76,8
<i>Lippia sidoides</i> (LG-102)	0,5xCC ₅₀	43,3	56,7
	1xCC ₅₀	27,2	72,8
	1,5xCC ₅₀	16,5	83,5

6. DISCUSSÃO

O câncer é um grave problema de saúde pública e uma das doenças que mais causa óbitos no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2017) cerca de 8,8 milhões de óbitos são decorrentes do câncer por ano, sendo esta doença responsável por uma a cada seis mortes no mundo (WHO, 2017). Além da gravidade, outros fatores como a resistência das células tumorais à terapia medicamentosa existente, bem como os efeitos colaterais causados por estas, revelam a necessidade da busca constante por novas moléculas ativas contra o câncer.

Vários estudos com produtos naturais vêm sendo realizados ao longo dos anos e esse interesse deve-se principalmente à gama de compostos com potencial atividade biológica. Nesse contexto, estão inseridos os óleos essenciais, metabólitos secundários de diversas espécies de plantas, como, por exemplo, os óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia gracilis* e *Lippia sidoides*, alvos de estudo neste trabalho. A atividade citotóxica de muitas espécies do gênero *Lippia* spp. e de seus componentes majoritários estão amplamente descritas na literatura sobre diversas linhagens de células tumorais.

Neste trabalho, foi possível observar que a linhagem celular de carcinoma de pulmão (A549) mostrou-se mais sensível aos óleos essenciais de *Lippia alba* (genótipo 57), *Lippia gracilis* (genótipo 106) e *Lippia sidoides* (genótipo 102) quando comparadas aos genótipos de LA-13, LG-110 e LS-104. Entretanto, os óleos essenciais com o mesmo componente majoritário apresentaram valores de CC_{50} próximos. Os óleos essenciais de LG-106 e LS-102 ($CC_{50} = 75,42 \mu\text{g/mL}$ e $CC_{50} = 97,93 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) que possuem como componente majoritário o timol, apresentaram IC_{50} menores do que os óleos essenciais de LS-104 e LG-110 ($CC_{50} = 150,70 \mu\text{g/mL}$ e $CC_{50} = 158,6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) que possuem o Carvacrol como composto em maior concentração. Do mesmo modo, os óleos essenciais de LA-13 e LA-57 que possuem concentrações maiores que 50% de carvona e 25% de limoneno em sua composição também apresentaram citotoxicidade próximas sobre as células A549.

Melo e colaboradores observaram o mesmo perfil de citotoxicidade para três diferentes genótipos de *Lippia gracilis* que tinham como compostos majoritários timol (genótipo 106) e carvacrol (genótipos 109 e 201), sendo o óleo rico em timol duas a quatro vezes mais citotóxico que os ricos em carvacrol para as linhagens B16 (melanoma murino) e HeLa (carcinoma de colo uterino) (MELO et al., 2014). Outro estudo que avaliou o potencial citotóxico do óleo essencial de *L. sidoides* rico em timol sobre células tumorais de carcinoma de cólon (linhagem CT26. WT) revelou grande citotoxicidade desta espécie com CC₅₀ igual a 19,05 µg/mL (GOMIDE et al., 2012).

A *Lippia alba* (genótipos 13 e 57) mostrou-se mais citotóxica para as células da linhagem A549 em relação as outras espécies estudadas (exceto LG-106). Santos e colaboradores (2016) avaliaram o potencial citotóxico de um quimiotipo de *L. alba* frente três linhagens de células tumorais A549 (carcinoma de pulmão), B16F10Next 2 (melanoma murino) e MCF-7 (câncer de mama) e obtiveram como resultado valores de CC₅₀ iguais a 63,98 µg/mL, 45,22 µg/mL e >100 µg/mL, para cada linhagem tumoral, respectivamente. Vale ressaltar que os terpenos encontrados nesse quimiotipo de *L. alba* (nerol/geraniol 27,09% e citral 21,87%) diferem dos estudados nesse trabalho (carvona e limoneno) (SANTOS et al., 2016). Recente estudo que avaliou o efeito citotóxico de quatro quimiotipos de *Lippia alba* sobre linhagens de células de câncer de pulmão (A549) e hepatocarcinoma (HepG2) afirmaram que essa espécie possui citotoxicidade seletiva frente essas linhagens com mecanismo de ação que envolve parada do ciclo celular e morte por apoptose (MONTERO-VILLEGAS et al., 2018). Gomide e colaboradores ao avaliarem o efeito citotóxico da *L. alba* também rica em carvona e limoneno sobre a linhagem de carcinoma de pulmão (A549) obtiveram como resultado CC₅₀ igual a 47,80 µg/mL após 72 horas de tratamento (GOMIDE et al., 2012).

A atividade anticancerígena do monoterpeno carvona foi avaliada recentemente em um estudo que comprovou que esta molécula é capaz inibir a proliferação celular bem como a expressão da proteína p-38, responsável pela ativação de genes antiapoptóticos, em células de câncer mieloma em concentração igual a 20 mM (DING, CHEN, 2018). Esse resultado mostra que o composto carvona possui atividade contra células do câncer assim como foi observado neste trabalho,

no qual o monoterpene apresentou CC_{50} igual a 1,1 mM sobre as células de carcinoma de pulmão.

Timol e carvacrol apresentaram citotoxicidade semelhante sobre as células de carcinoma de pulmão sendo as CC_{50} 88,25 $\mu\text{g/mL}$ e 71,92 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A atividade do composto carvacrol está descrito na literatura sobre diversas linhagens de células tumorais. Fan e colaboradores (2015) ao avaliarem a atividade do carvacrol em células de câncer de cólon (HTC 116 e LoVo) observaram que este monoterpene foi capaz de inibir a proliferação celular através da parada do ciclo celular na fase G2/M e da diminuição da expressão de ciclinas, assim como foi capaz de induzir apoptose celular através da via mitocondrial (FAN et al. 2015). Sobre o coriocarcinoma, tumor maligno caracterizado como uma doença trofoblástica gestacional, com grande poder metastático para órgãos como pulmão, rins e fígados o monoterpene carvacrol foi capaz de inibir a proliferação celular e induzir a apoptose através da ativação de proteínas proapoptóticas como Bax, Bac e citocromo C (LIM et al., 2018). Outro trabalho que avaliou a atividade antioxidante e pro oxidante, bem como a citotoxicidade dos compostos timol e carvacrol sobre células de carcinoma de pulmão de células não pequenas (linhagem H1299) mostrou que esses compostos possuem atividade citotóxica sobre essa linhagem celular, sendo capaz de causar efeito protetor na oxidação em baixas concentrações e oxidação celular em maiores concentrações (OZCAN, EDORGAN, 2012).

Os óleos essenciais são misturas complexas de vários compostos como monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Esses constituintes, em especial os de composição majoritária, são os responsáveis pelas atividades terapêuticas dos óleos (RUSSO et al., 2015). Sobre as células A549 avaliadas neste trabalho, foi possível observar que os compostos timol e carvacrol apresentaram maior cito toxicidade com CC_{50} de 71,91 $\mu\text{g/mL}$ e 88,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente e o composto carvona possui menor cito toxicidade com CC_{50} de 169,5 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, não é possível então afirmar que um único composto é responsável pela atividade do óleo, muitas vezes outro constituinte em menor concentração está agindo de forma sinérgica, antagônica ou aditiva na atividade. Os efeitos sinérgicos e aditivos dos componentes dos óleos essenciais podem atuar, por exemplo, sob características como o tipo de atração entre moléculas (hidrofílica ou lipofílica), na forma de fixação ou até mesmo na penetração das moléculas com potencial atividade dentro das células. Já os

constituintes de efeito antagônico nos óleos essenciais atuam diminuindo ou inibindo a atividade de outros compostos (MENEZES, 2016).

No processo de morte celular programada, conhecido como apoptose, as células sofrem estímulos que desencadeiam mudanças morfológicas e bioquímicas celulares. As principais alterações são condensação do material citoplasmático (picnose) com retração celular que leva a diminuição do contato intercelular e perda da aderência, condensação da cromatina que se concentra junto à membrana nuclear, fragmentação do material nuclear, um dos principais indicadores da apoptose que é ativado através da caspase 3 que cliva DFF40 responsável pela quebra de DNA nuclear, e formação de corpos apoptóticos, fase final da apoptose no qual o material celular é englobado em pequenas bolsas lipídicas formadas a partir dos prolongamentos celulares (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; MAJTNEROVÁ, ROUSAR, 2018). Neste trabalho foi possível observar que todas as concentrações avaliadas dos óleos essenciais de *Lippia gracilis* 106 e *Lippia sidoides* 102 foram capazes de produzir alterações morfológicas características da apoptose principalmente condensação citoplasmática, alteração observada como efeito de todas as concentrações dos óleos essenciais avaliadas.

Detectar o mecanismo de morte celular pode ajudar a entender como agem os óleos essenciais sobre as células tumorais, entretanto são necessários mais estudos para elucidar o mecanismo de ação dos mesmos. Quando comparado os resultados de alteração morfológica celular após tratamento com os óleos essenciais de LG-106 e LS-102, foi possível observar que estas alterações possuem as mesmas características, picnose, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos, do fármaco de referência doxorrubicina, na concentração de 5 µg/mL.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível observar a atividade citotóxica de diversas espécies de plantas do gênero *Lippia*. Os resultados mostraram que os óleos essenciais mais ativos (que apresentaram menor CC₅₀) foram os óleos de LG-106 e LA-57 cujos compostos majoritários são os monoterpenos timol e carvona, respectivamente. Foi possível observar também que os monoterpenos timol e carvacrol apresentaram maior citotoxicidade sobre as células de carcinoma de pulmão. Além da avaliação do potencial citotóxico dos óleos essenciais e monoterpenos, foi observada através da coloração GIEMSA as principais alterações morfológicas apresentadas pelas células da linhagem A549 após tratamento com *L. gracilis* 106 e *L. sidoides* 102 e os resultados obtidos sugerem que a morte celular se dá por apoptose. Quando analisadas as alterações morfológicas causadas pelo fármaco de referência Doxorrubicina (5 µg/mL) foi possível observar alterações semelhantes as causadas pelos óleos essenciais de *Lippia*. Logo, os resultados obtidos com este estudo indicam que os óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia gracilis* e *L. sidoides* são potenciais fontes de compostos de origem natural com atividade citotóxica com potencial aplicação para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, P. M., ROMERO, B. R., ROMERO, L. A., CRESPIAN, R. E. **Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta para a educação básica.** Lat. Am. J. Sci. Educ., 2, 22059, 2015.

ALMEIDA, P. O. S.; REIS, S. D.; FRANÇA M. N.; BLANK, A. F.; CORRÊA. C. B.; SCHER. R. **Atividade Citotóxica do Óleo Essencial de Lippia spp.** II Congresso Internacional de Inovação e 2º. Encontro de Jovens Investigadores em Engenharia Biotecnológica, 2016, Aracaju.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Lung cancer.** Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/lung-cancer.html>> Acessado em: 20 de março de 2018.

ARANGO, M. C. A., RAMOS, M. J., ZAPATA, B., DURÁN, C., GALVIS, B. L., STASHENKO, E. **Citral and carvone chemotypes from essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity.** Mem Inst Oswaldo Cruz, vol 104, n 6, 2009.

ARANHA, E. S. P. **Avaliação do potencial anticâncer *in vitro* de óleos essenciais de plantas do gênero *Eugênia*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Bioanálise e desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

ARAÚJO, F. J. E., ARAÚJO, L. M. Y. D., FREITAS, M. R., FERREIRA, P. M. P. **Aspectos toxicológicos da planta medicinal *sylvestris* Swartz: revisão de literatura.** Rev Ciênc Farm Básica Apl, 35(3), pag 355-361, 2014.

BLANCO, A. M., COLAREDA, A. G., VAN BAREN, C., BANDONI, L. A., RINGUELET, J. CONSOLINI, E. A. **Antispasmodic effects nad composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*.** Journal of ethnopharmacology, 149, pag 803-809, 2013.

BLOWMAN, K., MAGALHÃES, M., LEMOS, L. F. M., CABRAL, C., PIRES, M. **Anticancer properties of essential oils and other natural products.** Evidence-based complementary and alternative medicine, 2018.

BOTELHO, A. M., NOGUEIRA, P. A. N., BASTOS, M. G., FONSECA, C. G. S., LEMOS, G. L. T., MATOS, A. J. F., MONTENEGRO, D., HEUKELBACK, J., RAO, S. V., BRITO, C. A. G. **Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens.** Braz J Med Biol Res, vol 40, n 3, 2007.

BRAMMER, P. S., TONIAZZO, C., POERSCH, B. L. **Corantes comumente empregados na citogenética vegetal.** Biotechnology/Scientific communication. Arq. Inst. Biol., v. 82, p, 1-8, São Paulo, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. **Resolução – RDC, n. 2, de 15 de janeiro de 2007.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b> Acesso em: 25 de março de 2018.

CAMARGO, B. S., VASCONCELOS, A. S. F. D. **Atividade biológica de linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpeno.** Journal of medical and biological sciences, vol 13, n 3, 2014.

CAMILLO, C. F. ***Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson uma espécie nativa promissora para a introdução em programas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos.** Revista Fitos, Supl, 1-62, Rio de Janeiro, 2016.

CARVALHO A. F., MELO, V. M., CRAVEIRO, A. A., MACHADO, M. I., BANTIM, M. B., RABELO, E. F. **Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* linn.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 98(4):569-71, 2003.

CAVALCANTI, S. C., NICULAU, E. S., VAZIO, F. A., CÂMARA, C. A., ARAÚJO, I. N., ALVES, P. B. **Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch).** *Bioresour technol*, 101(2): 839-32, 2016.

CHACON, E., ACOSTA, D., LEMASTERS J. J. **Primary cultures of cardiac myocytes as *in vitro* models for pharmacological and toxicological assessments.** *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, pag. 209-223, 1997.

COSTA-JÚNIOR, M. L., MILLER, J. R., ALVES, B. P., BLANK, F. A., LI, Y. A., LÉON, P. A. A. **Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** *Veterinary Parasitology*, vol. 228, pag. 60-64, 2016.

DING, X. CHEN, H. **Anticancer effects of Carvone in myeloma cells is mediated through the inhibition of p38 MAPK signalling pathway, apoptosis induction and inhibition of cell invasion.** *J Buon*, 23(3): 747-751, 2018.

DODURGA, Y., SEÇME, M., LALE, S. T. N. **A novel oncogene URG4/URGCP and its role in cancer.** *Gene*, 2018.

DORWARD, A.D., WALSH, K., ONISCU, A. WALLACE, A. W. **Molecular pathology of non-small cell lung cancer.** *Diagnostic Histopathology*, vol 23, pag. 450-457, 2017.

FAN, K., LI, X., CAO, Y., QI, H. LI, L., ZHANG, Q., SUN, H. **Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells.** *Anticancer Drugs*, 26(8):813-23, 2015.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, M. D., FORMAN, D., BRAY, F. **Cancer incidence and**

mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int. J. Cancer 136, p 359-386, 2015.

FONTES, S. P. A., ALMEIDA, G. S, NADER, A. L. **COMPOSTOS DE PLATINA EM QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER.** QUIMICA NOVA, vol 20, ed 4, 1997.

GOMES, F. V. S., NOGUEIRA, L. C. P., MORAES S. R. V. **Aspéctos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer.** Eclet. Quím. vol 36, nº 1, São Paulo, 2011.

GOMIDE, S. M., LEMOS, O. F., LOPES, P. T. M., ALVES, A. M. T., VICCINI, F. L., COELHO, M. C. **The effect of the essential oils from Five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines.** Rev bras farmacogn, vol 23, n 6, 2013.

GRIVICICH, I., REGNER, A. ROCHA, B. A. **Morte celular por apoptose.** Revista Brasileira de Cancerologia, 53(3): 335-43, 2007.

GUARISCHI, A., RAMOS, R. J. **Colégio Brasileiro de Cirurgiões.** Programa de Auto-Avaliação em Cirurgia, 2001.

HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., DERMONT, C., JOSEPH, H., BAILLEUL, F. **The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French over-seas departments and review of previous works.** Chem Biodivers 3: 1116 -1125, 2006.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; HENRY, J.; BAILLEUL, F..**Ethnopharmacology of *Lippia alba*.** Journal of Ethnopharmacol 116: 211-222. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). **Fisiopatologia do câncer.** 2 e., INCA, p 55-81, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa I 2018: Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).
O que é o cancer?. Disponível em:
<http://inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> Acesso em: 20 de março de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA).
Estadiamento. Disponível em <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54>
Acesso em: 01 de maio de 2018.

JI, J., ZHANG, L., WU, Y. Y., ZHU, X. Y., LV, S.Q., SUN, X. Z. **Induction of apoptosis by d-limonene is mediated by a caspase-dependent mitochondrial death pathway in human leukemia cells**. Leuk Lymphoma, 47(12):2617-24, 2006.

JÚNIOR, F. A. P., RIOS, C. M., MOURA, A. T., ALMEIDA, P. R., ALVES, B. P., BLANK, F. A., FERNANDES, M. P. R., SCHER, R. **Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham**. Biol Res, 45: 399-402, 2012.

JÚNIOR, V. C., BOLZANI, S. V., BARREIRO J. E. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Quim. Nova, vol. 29, n. 2, São Paulo, 2006.

KANAPATHIPILLAI, M. **Treating p53 mutant aggregation-associated cancer**. Cancers, 10(6):154, 2018.

KOFF, L. J., RAMACHANDIRAN, S., BERNAL-MIZRACHI, L. **A time to kill: targeting apoptosis in cancer**. Int. J. Mol. Sci., vol. 16, ed. 2, 2942-2955, 2015.

LEITE, G. V. A. C., COSTA, G. V. J., CALLADO, B. R., TORRES, L. N. J., JÚNIOR, L. P. C. R., RIBEIRO, A. R. **Receptores tirosina-quinase: implicações no câncer**. Rev Bras de Onc Clin, vol 8, n 29, 2012.

LIM, W., HAM, J., BAZER, W. F., SONG, G. **Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis via disruption of calcium homeostasis in human choriocarcinoma cells**. Journal of Cellular Physiology, 1-13, 2018.

LOBO, D. L. P., MARQUES, V. R. A. L., GURGEL, F. M., SOARES, L. J., FONSECA, C. G. S., MORAES, A. E. M. **Atividade farmacológica do óleo essencial de *Lippia sidoides* em odontologia: Uma revisão de literatura.** Revista Saúde e Pesquisa, vol 8, n 2, pag 373-378, 2015.

LÓPEZ, L. N., NAIR, V. BANG, Y. W. ZEVALLOS-CISNEROS, L., HEREDIA, B. J. **Protective role of terpenes and polyphenols from three species of orégano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells.** Journal of ethnopharmacology, vol 187, pag 302-312, 2016.

MACEDO, B. A. J. **Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde: contribuição para profissionais prescritores.** Instituto de Tecnologia em Fármacos, Pós-graduação em Gestão da Inovação de Medicamentos da Biodiversidade na modalidade EAD, Rio de Janeiro, 2016.

MAJTNEROVÁ, P. ROUSAR, T. **An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation.** Molecular Biology Reports, 2018.

MAROYI, A. ***Lippia javanica* (Burm.f.) Spreng.: Traditional and commercial uses and phytochemical and pharmacological significance in the african and indian subcontinent.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017.

MELO, O. J., BITENCOURT, A. T., FACHIN, L. A., CRUZ, O. M. E., JESUS, R. C. H., ALVES, B. P., BLANK, A. F. M., FRANCA, C. S., BELEBONI, O. R., FERNANDES, M. P. R., FITZGERALD, A., SCHER, R. **Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schaues genotypes.** Acta tropica, vol 128, ed 1, pag 110-115, 2013.

MELO, O. J., FACHIN, L. A., RIZO, F. W., JESUS, R. C. H., BLANK, A. F. M., ALVES, B. P., MARTINS, A. M., BLANK, F. A. **Cytotoxic effects of essential oils**

from three *Lippia gracilis* Schaues genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 and normal human fibroblasts. *Genetics and molecular research*, 13(2):2691-97, 2014.

MENDES, S. S., BOMFIM, R. R., JESUS, R. C. R., ALVES, B. P. BLANK, F. A., ESTEVAM, S. C., ANTONIOLLI, R. A., THOMAZZI, M.S. **Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves.** *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 129, ed. 3, pag. 391-397, 2010.

MENEZES, S. M. **Caracterização química e efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* e seus constituintes majoritários sobre *Aceria guerreronis* (Acari: Eriophyidae).** Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe, 2016.

MILLER, D. K., SIEGEL, L. R., LIN, C. C., MARIOTTO, B. A., KRAMER, L. J., ROWLAND, H. J., STEIN, D. K., ALTERI, R., JEMAL, A. **Cancer treatment and survivorship statistics, 2016.** CA: A Cancer Journal for Clinicians, vol. 66, ed. 4, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ABC do câncer. Abordagens básicas para o controle do câncer.** Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 3ª ed. rev. atual. Rio de Janeiro, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Políticas nacionais de plantas medicinais e fitoterápicos.** Departamento de Assistência Farmacêutica, Brasília, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (RENISUS).** Fevereiro, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção a Saúde. **Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Pulmão. Portaria Nº 600, de 26 de junho de 2012.** 2012.

MONTERO-VILLEGAS, S., CRESPO, R., RODENAK-KLADNIEW, B. CASTRO, A. M., GALLE, M. CICCÍÓ, F. J., BRAVO, G.M., POLO, M. **Cytotoxic effects of**

essential oils from four *Lippia alba* chemotypes in human liver and lung cancer cell lines. Journal of Essential Oil Research, vol. 30, sessão 3, 2018.

MORAIS, R. S., OLIVEIRA, S. L. T., OLIVEIRA, P. L., TRESVENZOL, F. M. L., CONCEIÇÃO, C. E., REZENDE, H. M., FIUZA, S. T., COSTA, A. E., FERRI, H. P., PAULA, R. J. **Essential oil composition, antimicrobial and pharmacological activities of *Lippia sidoides* Cham, (Verbenaceae) from São Gonçalo do Abaeté, Minas Gerais, Brazil.** Pharmacogn. Mag., 12(48): 262–270, 2016.

MORAIS, R. S., OLIVEIRA, S. L. T., BARA, F. T. M., CONCEIÇÃO, C. E., REZENDE, FERRI, H. P., PAULA, R. J. **Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brasil.** Pag 4, 2012.

MOREIRA, D. R., LEÃO, M. M. K., BARRETO, S. R. J., JUNIOR, O. M. A., SANTOS, B. A. J., MOREIRA S. J. J. **Um olhar sobre a pesquisa com óleos essenciais no Brasil a partir da base de dados Scielo.** Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica, vol 2/n.1/p. 104-110, 2014.

NEVES, A. P., VARGAS, M. D. **Complexos de platina (II) na terapia do câncer.** Ver. Virtual Quim., vol 3, ed 3, pag 196-209, 2011.

NEWMAN, J. D., CRAGG, M. G. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014.** J. Nat. Prod. 79, 3, 629-661, 2016.

OLIVEIRA, R. D., LEITÃO, G. G., SANTOS, S. S., BIZZO, R. H., LOPES, D., ALVIANO, S. C., LEITÃO, G. S. **Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil.** Journal of ethnopharmacology, vol 108, ed 1, pag 103-108, 2006.

OSMANI, L., ASKIN, F., GABRIELSON, E., LI, K. Q. **Current WHO guidelines and critical role of immunohistochemical markers in the subclassification on non-**

small cell carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. Seminars in Cancer Biology, Dep. Pathology, Johns Hopkins Medical Institutions, 2017.

OZCAN, A., ERFOGAN, A. **A comparative study of antioxidante/prooxidante effects of carvacril and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells.** Natural Product Communications, 7(12): 1557-60, 2012.

PALATO, B. P. C., BONFANTE, S. M. G., ANDRADE, G. I. E., ACURCIO, A. F., MACHADO, J. C., CHERCHIGLIA, L. M. **Análise de sobrevida em pacientes com câncer de pulmão tratados no Sistema Único de Saúde no Brasil entre 2002 e 2003.** Cad. Saúde Colet., 21 (2): 173-81, 2013.

PASCUAL, E. M., SLOWING, K., CARRETERO, E., MATA, S. D., VILLAR, A. **Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review.** Journal of ethnopharmacology, vol 76, ed 3, pag 201-214, 2001.

PENG, Y., CHEN, Y., ZHANG, X., YANG, Y., CAO, D., BI, F., LI, Z., GOU, H. **Tumoral cavitation in colorectal cancer patients with unresectable lung metastasis treatment with bevacizumab and chemotherapy.** J. Cancer Res Clin Oncol, 2018.

PORFÍRIO E. M., MELO, M. H., PEREIRA, G. M. A., CAVALCANTE, A. T. T., GOMES, A. G., CARVALHO, G. M., COSTA, A. R., JÚNIOR, C. A. E. F. **In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of Lippia alba Essential Oil, Citral, and Carvone against Staphylococcus aureus.** The Scientific World Journal, 2017.

RIBEIRO, S. S., JESUS, M. A., SILVA, B. T., SANTOS, C. D. A., JESUS, R. J., ANDRADE, S. M., SAMPAIO, S. T., GOMES, F. W., ALVES, B. P., CARVALHO, A. A., PESSOA, C., MORAES, O. M., PINHEIRO, B. L. M., PRATA, N. P. A., BLANK, F. A., SILVA-MANN, R., MORAES, S. R., COSTA, V. E., NOGUEIRA, L. C. P., BEZERRA, P. D. **Evaluation of the cytotoxic activity of some brazilian medicinal plants.** Plant. Med., 78(14), 1601-1606, 2012.

RUSSO, R., CORASANITI, T. M., BAGETTA, G., MORRONE, A. L. **Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy.** Hindawi Publishing Corporation, vol 2015, 2015.

SALEHI, B., ZUCCA, P., SHARIFI-RAD, M., PEZZANI, R., RAJABI, S., SETZER, N. W., VARONI, M. E., IRITI, M., KOBARFARD, F., SHARIFI-RAD, J. **Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis.** Phytotherapy Research, 1-25, 2018.

SALIMENA G. R. F. **Uma nova espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae) do cerrado brasileiro.** Acta Bot Bras, vol 24, n 1, 2010.

SAMPAIO, F. **Hipóteses filogenéticas de espécies sul americanas do gênero *Lippia* spp. (Verbenaceae) com base em sequências nucleotídicas.** Universidade Federal de Juiz de Fora, 2009.

SANTARELLI, A., MASCITTI, M., LO RUSSO, L., SARTINI, D., TROIANO G., EMANUELLI, M., LO MUZIO, L. **Survivin-Based treatment strategies for squamous cell carcinoma.** Int. J. Mol. Sci., vol. 19, ed. 4, 971, 2018.

SANTOS, A. G. I., SCHER, R., ROTT, B. M., MENEZES, R. L., COSTA, V. E., CAVALCANTI, H. C. S., BLANK, F. A., AGUIAR, S. J., SILVA, G. T., DOLABELLA, S. S. **Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites.** Parasitol Res, 115:535-540, 2016.

SANTOS, O. N., PASCON, C. R., VALLIM, A. M., FIGUEIREDO, R. CARLOS, SOARES, G. M., LAGO, G. H. J., SATORELLI, P. **Cytotoxic and antimicrobial constituents from the essential oil of *Lippia alba* (Verbenaceae).** Medicines, 3(3): 22, 2016.

SCHEIN, F. C., MARQUES, A. R., VARGAS, L. C., KIRSTEN, R. V. **Efeitos colaterais da quimioterapia em pacientes oncológicos hospitalizados.** Disc. Scientia., v. 7, n. 1, p. 101-107, 2006.

SILVA, H. A. S., BUTERA, P. A., LEAL, S. H. D., ALVES, J. R. **Agentes antitumorais da angiogênese – Modelos farmacológico para inibidores da integrina $\alpha v \beta 3$** . Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol 43, n 1, 2007.

SILVA, M. F. A. **Análise dos efeitos agudos e/ou tardios em crianças, adolescente e adultos jovens submetidos à radioterapia conformacional para o tratamento do linfoma de Hodgkin**. Universidade Federal de Campinas/Faculdade de Ciências Médicas, 2016.

SIMÕES, E. R., SANTOS, E. A., ABREU, M. C., SILVA, J. N., NUNES, N. M., COSTA, M. P., PESSOA, O. D., PESSOA, C., FERREIRA, P. M. **Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. And its essential oils**. J Intercult Ethnopharmacol 4(3): 256-263, 2015.

SOARES, V. S., TAVARES-DIAS, M. **Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura**. Biota Amazônia, vol 3, n 1, pag 109-123, 2013.

SOUZA, B. V., SILVA, N. E., RIBEIRO, L. M., MARTINS, A. W. **Hipertensão arterial no paciente com câncer**. Arq. Bras. Cardiol., vol 104, n 3, 2015.

TORRE, A. L., FREDDIE, B., SIEGEL L. R., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J., JEMAL A. **Global Cancer Statistic, 2012**. CA CANCER J CLIN, vol 65, 2015.

WEAVER, H., COONAR, S.A. **Lung cancer: diagnosis, staging and treatment**. Oxford, vol 35, ed 5, pag 247-254, 2017.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs**. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/detail/03-02-2017-early-cancer-diagnosis-saves-lives-cuts-treatment-costs>. Acesso em < 14 de agosto de 2018>.

YANG, Y., YUE, Y., RUNWEI, Y., GOULIN, Z. **Cytotoxic, apoptotic and antioxidant activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko***. Bioresource technology, vol 101, ed 11, pag 4205-4211, 2010.

ZHANG, H. D., ZHANG L. Y., LIU J.D. YANG F., ZHAO, Z. J. **Expression and significance of MMP-9 and MDM2 in the oncogenesis of lung câncer in rats**. Asian Pacific Journal of Ttopical Medicine, 595-588, China, 2014.