



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA
E BIODIVERSIDADE**

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
LIPPIA SPP. FRENTE A CÉLULAS DA LINHAGEM A549 DE
CARCINOMA DE PULMÃO HUMANO**

PATRÍCIA DE OLIVEIRA SANTOS ALMEIDA

2016



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – POSGRAP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE -
PPGAGRI**

PATRÍCIA DE OLIVEIRA SANTOS ALMEIDA

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
LIPPIA SPP. FRENTE A CÉLULAS DA LINHAGEM A549 DE
CARCINOMA DE PULMÃO HUMANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientador
Prof. Dr. Ricardo Scher.

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2016

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A447a Almeida, Patrícia de Oliveira Santos
Atividade citotóxica do óleo essencial de *Lippia* SPP.
Frente a células da linhagem A549 de carcinoma de pulmão
humano / Patrícia de Oliveira Santos Almeida ; orientador
Ricardo Scher. – São Cristóvão, 2016.
41 f. : Il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) –
Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Essência e óleos essenciais. 2. *Lippia gracilis*. 3.
Lippia sidoides. 4. *Lippia alba*. 5. Pulmões – Câncer. I.
Scher, Ricardo, orient. II. Título.

CDU: 606:633.812

PATRÍCIA DE OLIVEIRA SANTOS ALMEIDA

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA* SPP. FRENTE A
CÉLULAS DA LINHAGEM A549 DE CARCINOMA DE PULMÃO HUMANO**

Dissertação/Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em dia 07 de abril de 20 16.

Prof. Dr. Ana Cristina Nascimento Pinheiro
Universidade Tiradentes -UNIT –

Prof. Dr. Ricardo Luiz C. de Albuquerque Junior
Universidade Tiradentes -UNIT

Prof. Dr. Ricardo Scher
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

“Jesus, porém, respondendo, disse-lhes: Em verdade vos digo que, se tiverdes fé e não duvidardes, não só fareis o que foi feito à figueira, mas até se a este monte disserdes: Ergue-te, e precipita-te no mar, assim será feito”;

“E, tudo o que pedirdes em oração, crendo, o recebereis”.

Mateus 21 Versículos 21 e 22.

Dedico: Aos meus filhos.

AGRADECIMENTOS

Não poderia iniciar estes agradecimentos sem elevar meu coração aos céus e citar o versículo do apóstolo Matheus “E, tudo o que pedirdes em oração, crendo, o recebereis”. Mateus 21.22. Cito este versículo, pois, Deus em sua infinita bondade se faz presente em todos os momentos da minha vida e permitiu que uma nova oportunidade me fosse dada e permite que hoje eu possa estar agradecendo por mais uma vitória alcançada. Obrigada meu Deus porque você é muito bom!

À minha família, meu alicerce. Aos meus queridos pais que na sua simplicidade sempre torceram por todas as minhas vitórias na vida estudantil, e sempre se fizeram presentes, abdicando de seus sonhos para a realização dos sonhos de suas filhas. Amo vocês e eternamente serei grata.

Aos meus filhos Ana Beatriz e Rafael, os maiores e melhores tesouros da minha vida! Meu amor incondicional!

Ao meu marido e eterno namorado, Manoel, por todo apoio e incentivo demonstrados, mesmo nos meus momentos de stress máximo, devido a intensa jornada de trabalho e estudo, sempre procurava uma maneira irreverente de me fazer enxergar que tudo passa! Obrigada! Te amo!

À minha querida irmã Juliana Larissa por toda torcida.

Ao meu querido orientador Dr. Ricardo Scher, palavras não são suficientes para expressar a gratidão que sempre terei por este ser humano ímpar, primeiro pela oportunidade de ser sua orientanda em um dos momentos mais tristes da minha vida, segundo pelo encorajamento e otimismo em todos os momentos dos experimentos do nosso projeto. Só tenho a agradecer, agradecer e agradecer! Que Deus o abençoe e ilumine sempre! Muito Obrigada!

À minha co-orientadora Dr^a. Cristiane Bani, por todos os ensinamentos sobre cultura de células, muito obrigada pela disposição, paciência e pela parceria! Agradeço de coração!

Aos meus amigos do laboratório de Biologia Celular e Cultura de Células, em especial a Juliana Cerqueira, Franciel, Mariana, Audrey, Mona, Érica e Nancy. Meu Deus o que teria sido de mim sem vocês? Obrigada por toda disposição, afeto, solidariedade. Aprendi muito com todos vocês! Beijo no coração de cada um!

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade, em especial ao prof. Dr. Arie Fitzsgerald Blank pela doação dos óleos essenciais de *Lippia spp.*

As minhas coordenadoras e amigas da Universidade Tiradentes por toda torcida e incentivos. Em especial as Dr^{as}. Ana Paula Prata e. Ana Cristina Pinheiro.

À direção de Saúde da Universidade Tiradentes representada pelos professores Dr. Hesmoney Santa Rosa e Dr^a. Wanessa Lordelo, obrigada pelo apoio e incentivos no momento em que mais precisei.

Ao meu eterno prof. Dr. Ricardo Albuquerque, obrigada pela disponibilidade, conselhos e incentivos.

Por fim, são muitos nomes, muitos rostos e significados. Por mais que eu busque palavras para evidenciar a minha gratidão, nenhuma será capaz de definir o que sinto, então, só me resta sentir com certeza!

SUMÁRIO

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>i</i>
<i>LISTA DE TABELAS (ARTIGO 1)</i>	<i>ii</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i>	<i>iii</i>
<i>RESUMO</i>	<i>iv</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>v</i>
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Câncer e Processo de Carcinogênese	2
2.1.2 Carcinoma de Pulmão e sua importância epidemiológica	2
2.1.3 Terapias convencionais para o tratamento do câncer	3
2.1.4 Produtos Naturais	4
2.1.4.1 Plantas do gênero Lippia	4
2.1.4.1.1 Lippia gracilis Schauer	5
2.1.4.1.2 Lippia alba (Mill.) N. E. Brown	5
2.1.4.1.3 Lippia sidoides Cham.	6
3. CONCLUSÕES GERAIS	7
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
5. ARTIGO 1: ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA SPP. FRENTE A CÉLULAS DA LINHAGEM A549 DE CARCINOMA DE PULMÃO HUMANO	13
RESUMO	13
ABSTRACT	14
5.1. Introdução	14
5.2. Material e Métodos	15
5.2.1 Plantas	15
5.2.2 Extração do óleo essencial	15
5.2.3 Análise Química	16
5.2.4. Linhagens e Cultivo Celular	17
5.2.5 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial citotóxico dos óleos essenciais	17
5.2.6. Análise morfológica – Coloração por hematoxilina e eosina	17
5.2.8 Análise Estatística	18

5.3 Resultados	18
5.3.1 Composição química dos óleos essenciais de espécies de <i>Lippia spp.</i>	18
5.3.2 Avaliação da atividade citotóxica dos óleos essenciais de <i>Lippia spp.</i> em células A549	20
5.3.2.1 Avaliação da proliferação de células A549 - Método de MTT	20
5.3.2 Alterações morfológicas induzidas pelos óleos essenciais de <i>Lippia</i> em células da linhagem A549	21
5.4 Discussão	25
5.5 Referências Bibliográficas	27

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Imagem representativa de células de carcinoma de pulmão (A549), visualizadas através do microscópio invertido..... 3

FIGURA 2: Estruturas da Daunorrubicina e Doxorubicina..... 4

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO 1)

FIGURA 1. Viabilidade das células de carcinoma de pulmão (A549) expostas a concentrações crescentes do óleo essencial de diferentes genótipos de *Lippia*..... 20

FIGURA 2: Aspectos morfológicos de células A549 após tratamento com óleos essenciais dos diferentes genótipos de *Lippia*..... 23

FIGURA 3. Avaliação quantitativa da ocorrência de células A549 morfológicamente alteradas pelo tratamento com os óleos essenciais de *Lippia* spp. 26

LISTA DE TABELAS (ARTIGO 1)

	Página
TABELA 1: Genótipos de <i>Lippia gracilis</i> coletados no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe.....	16
TABELA 2. Composição química dos óleos essenciais de espécies de <i>Lippia spp.</i>	20
TABELA 3: Valores de IC50 obtidos em células de carcinoma de pulmão (A549) tratadas com óleo essencial de <i>L. gracilis</i> genótipos LG-106 e LG-110; <i>Lippia alba</i> LA-13 e LA-57 e <i>Lippia sidoides</i> LS-102 e LS-104.	22
TABELA 4: Porcentagem de células com morfologia normal e alterada quando tratadas com a IC50 de cada genótipo.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

CPCP	Carcinoma de Pulmão de Células Pequenas
CPCNP	Carcinoma de Pulmão de Células Não Pequenas
UFS	Universidade Federal de Sergipe
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
SFB	Soro Fetal Bovino
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ANOVA	Análise de Variância (Analysis of Variance)
IC 50	Concentração Capaz de Inibir 50% de um processo (Concentração Inibitória)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Tetra-Acético Etilenodiamino
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mg	Miligrama
dL	Decilitro
g	Gramma
nm	Nanômetro
RPM	Rotação por Minuto
UV	Ultravioleta
DNA	Ácidos Desoxirribonucléicos
UICC	International Union Against Cancer
µg	Micrograma
mL	Mililitro
CG - FIT	Cromatografia gasosa - Detector por Ionização de Chama
ATCC	American Type Culture Collection, ATCC
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
LG-10	Genótipo 106 de <i>Lippia gracilis</i>
LG-110	Genótipo 110 de <i>Lippia gracilis</i>
LS-102	Genótipo 102 de <i>Lippia sidoides</i>
LS-104	Genótipo 104 de <i>Lippia sidoides</i>
LA-13	Genótipo 13 de <i>Lippia alba</i>
LA-57	Genótipo 57 de <i>Lippia alba</i>

RESUMO

ALMEIDA, Patrícia de Oliveira Santos. **Atividade citotóxica do óleo essencial de *Lippia* spp. frente a células da linhagem A549 de carcinoma de pulmão humano.** São Cristovão: UFS, 2016. 41p (Dissertação/Tese – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade). *

Os carcinomas de pulmão destacam-se como um grave problema de saúde pública, pois, encontram-se entre as principais causas de morte por câncer no mundo. São classificados em dois principais grupos histológicos: carcinoma de pulmão de células pequenas (CPCP) e carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP). Na busca por terapias inovadoras, diversos produtos naturais derivados de plantas e outros organismos têm sido estudados para utilização como fonte para o desenvolvimento de quimioterápicos empregados no tratamento de diversos tipos de câncer, inclusive dos carcinomas de pulmão. Nesse contexto, insere-se os óleos essenciais produzidos por plantas medicinais como as do gênero *Lippia* que apresentam diversas propriedades terapêuticas, dentre elas, atividade antimicrobiana, antiinflamatória e antiproliferativa. O presente trabalho propõe a investigação da atividade citotóxica dos óleos essenciais de diferentes espécies e genótipos de plantas do gênero *Lippia*. do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe (UFS), localizado na Fazenda Experimental “Campus Rural da UFS”, que apresentam variada composição química. Para isso as células A549 (Carcinoma de pulmão), foram tratadas com concentrações crescentes (20 a 160 µg/mL) de óleos essenciais de *Lippia gracilis* (genótipos 106 e 110), de *Lippia alba* (genótipos 13 e 57) e *Lippia sidoides* (genótipos 102 e 104) durante o intervalo de 24 horas. A citotoxicidade destes óleos essenciais foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. Os valores das absorbâncias obtidas nos tratamentos foram normalizados com os das células não tratadas e utilizados para calcular os valores de IC por análise de regressão. Valores de IC₅₀ de 75,42 e 158,6 µg/mL foram obtidos para os genótipos LG-106 e LG-110, respectivamente. Para os genótipos LS-102 e LS-104 as IC₅₀ foram, respectivamente, 97,93 e 150,70 µg/mL e para os genótipos LA-13 e LA-57 estes valores foram 86,14 e 70,34 µg/mL. A análise microscópica das células coradas por hematoxilina-eosina revelou alterações morfológicas incluindo condensação do citoplasma, condensação da cromatina e a fragmentação nuclear induzidas por todos os genótipos avaliados. Estes resultados sugerem que atividade citotóxica apresentada pelos óleos essenciais de *Lippia* sobre células da linhagem A549 envolve a indução de morte celular programada. Com isso, conclui-se que tais óleos representam uma fonte promissora de compostos para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

Palavras chave: Câncer de pulmão, óleo essencial, *Lippia gracilis*, *Lippia sidoides*, *Lippia alba*

* Comitê Orientador: Ricardo Scher – UFS (Orientador), Cristiane Bani Corrêa (Co-Orientadora) – UFS

ABSTRACT

ALMEIDA, Patrícia de Oliveira Santos. **Cytotoxic activity of the essential oil of *Lippia* spp. Facing cells of A549 line of human lung carcinoma.** São Cristovão: UFS, 2016. 41p (Dissertation / Thesis - Master in Agriculture and Biodiversity). *

The lung carcinomas stand out as a major public health problem, therefore, are among the leading causes of cancer death worldwide. They are classified into two major histological groups: small cell lung carcinoma (SCLC) and non small cell lung carcinoma non (NSCLC). In the search for novel therapies, many natural products derived from plants and other organisms has been studied for use as a source for the development of chemotherapeutic agents used in the treatment of various cancers, including carcinomas of the lung. In this context, the essential oils is part of medicinal plants produced by such as the genus *Lippia* that have many therapeutic properties, among them, antimicrobial, anti-inflammatory and antiproliferative. This study proposes to investigate the cytotoxic activity of essential oils of different species and genotypes of the genus *Lippia* plants. the Active Germplasm Bank of the Federal University of Sergipe (UFS) located at the Experimental Farm "Rural Campus of the UFS," which have varied chemical composition. For this A549 cells (lung carcinoma) were treated with increasing concentrations (20-160 / mL) essential oils *Lippia gracilis* (genotypes 106 and 110) of *Lippia alba* (genotypes 13:57) and *Lippia sidoides* (genotypes 102 and 104) during the 24 hour interval. Cytotoxicity of these essential oils was determined by the MTT colorimetric method. The absorbance values obtained in the treatments were normalized to the untreated cells and used to calculate IC₅₀ values by regression analysis. IC₅₀ values of 75.42 and 158.6 ug / ml were obtained for the LG-106 and LG-110 genotypes, respectively. For LS-102 and LS-104 genotypes IC₅₀ were respectively 97.93 and 150.70 mg / mL and LA-13 and LA-57 genotypes these values were 86.14 and 70.34 mg / mL . Microscopic analysis of cells stained by hematoxylin-eosin showed morphological changes, including condensation of cytoplasm, chromatin condensation and nuclear fragmentation induced by all genotypes. These results suggest that the cytotoxic activity presented by the essential oils of *Lippia* on A549 lineage cells involves induction of programmed cell death. Therefore, it is concluded that these oils represent a promising source compounds for the development of new anti-tumor therapies.

Keywords: Lung cancer, essential oil, *Lippia gracilis*, *Lippia sidoides*, *Lippia alba*

* Supervising Committee Ricardo Scher – UFS (Advisor), Cristiane Bani Correa (Co-Orientadora).

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é uma doença de forte impacto na saúde pública, representando uma das principais causas de morte no mundo (CHEN et al., 2013; GOMPEL et al., 2013; HUSSAIN e SULLIVAN, 2013). Entre os tipos de câncer, um dos mais incidentes é o carcinoma de pulmão de células não pequenas o qual é um tipo de câncer particularmente agressivo e constitui aproximadamente 85% das malignidades primárias de pulmão (ZHANG et al., 2013).

Os carcinomas de pulmão são mais frequentes em pessoas com idade avançada (cerca de 70 anos), sendo que a maior parte destes pacientes apresenta doença avançada e invasiva, limitando assim o sucesso das terapias (EDGE et al., 2010). Entre as terapias, a mais frequentemente utilizada é a quimioterapia, porém, nos casos da doença avançada é indicada apenas como paliativo, tendo como objetivo controlar os sinais e sintomas da doença e assim proporcionar uma melhor qualidade de vida ao paciente (THONGPRASERT et al., 2011). Mundialmente produtos naturais extraídos de plantas são utilizados para este fim tanto pelo seu potencial terapêutico como pela sua composição química e farmacológica (HERNANDEZ et al., 2003). Entre as plantas utilizadas em pesquisas, mais de 1000 espécies apresentaram atividade antitumoral significativa (MUKHERJEE et al., 2001; FERRAZ et al., 2005).

Neste contexto, os novos medicamentos à base de produtos naturais com efeito antitumoral tornaram-se uma terapia alternativa para o tratamento de diversos tipos de cânceres, pois, produtos naturais apresentam diversas substâncias com prováveis agentes terapêuticos, desta forma são fontes utilizadas em larga escala na indústria farmacêutica. Entre os produtos naturais extraídos de plantas, destacam-se os óleos essenciais, devido as suas importantes atividades biológicas que estão relacionadas com a sua grande diversidade química, como flavonoides, ácidos fenólicos e diterpenos (BRESSAN, 2014). Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias odoríferas que geralmente apresentam múltiplas propriedades farmacológicas que são influenciadas pela diversidade dos componentes presentes em sua composição (BAKKALI et al., 2008). Diversos são os benefícios do uso de óleos essenciais entre eles destacam-se: atividade citotóxica, antimicrobiana, anti-inflamatória, além de antiviral (MESA-ARANGO et al., 2009).

Diversas plantas destacam-se na medicina devido ao seu forte potencial antitumoral e entre elas as plantas do gênero *Lippia*, óleos essenciais extraídos destas plantas apresentam diversas atividades biológicas, entre elas destacam-se antimicrobiana, fungicida, antitumoral, atividade contra o mosquito *aedes aegypti* (GUILHON et al., 2011).

Deste modo a análise da atividade citotóxica dos óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* pode levar a identificação de novos compostos que possam contribuir no tratamento mais eficaz dos carcinomas com diminuição dos efeitos colaterais. Assim o objetivo geral deste trabalho foi a investigação da atividade citotóxica dos óleos essenciais de diferentes espécies de plantas do gênero *Lippia* que apresentam variada composição química.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer e Processo de Carcinogênese

O câncer é uma doença que afeta indivíduos em todo o mundo (PRADO, 2014). É caracterizado por uma proliferação desordenada de determinadas células do corpo, sendo uma das mais sérias doenças do mundo e assim como as doenças cardiovasculares, é responsável pela morte de milhares de pessoas (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Os tipos de câncer são organizados por categorias e nela se enquadram os carcinomas, que são tumores malignos que se originam a partir do tecido epitelial. Os carcinomas mais comuns são os de mama, de pulmão, de bexiga, de próstata, de pele, de estômago e de pâncreas (INCA, 2013).

Em muitos casos, as causas não são bem esclarecidas, porém, fazendo referência aos carcinomas de pulmão um dos fatores mais comuns é o fumo como causador relacionado com a indução da carcinogênese para este órgão (RUDDON, 2007).

Trata-se de uma patologia que se caracteriza pelo crescimento e multiplicação desordenada de células comprometidas geneticamente, estas células, inibem a apoptose e passam a invadir tecidos subjacentes, além de possuir o forte potencial de migração para outros locais do organismo humano (TARVER, 2012).

A carcinogênese é o processo pelo qual se dá a formação do câncer, este é um processo lento e que pode levar até anos para que as células se proliferem de forma que possam ser diagnosticadas, o que impossibilita na maioria das vezes o diagnóstico precoce. O processo de carcinogênese é dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão (RUDDON, 2007).

A apoptose é um mecanismo de morte celular essencial altamente conservado e importante para o desenvolvimento normal e a supressão da oncogênese (CUI et al., 2007). Vários são os estímulos que podem desencadear o processo apoptótico resultando na ativação de caspases através da via extracelular, por meio de receptores de membrana (*e.g.*, fator de necrose tumoral – TNF e FAS) ou da via intracelular (via mitocondrial). Deste modo, estes tipos de alterações tornam-se alvo para a terapia do câncer (RUFINI e MELINO, 2011).

A primeira etapa ocorre através da exposição ao carcinógeno (como os agentes da combustão do tabaco), resultando em mutações de genes alvos do DNA, culminando com a transformação celular, nesta fase não é possível detectar o tumor. Após esta fase dá-se início a promoção que somente ocorrerá a partir da exposição prolongada ao agente promotor. Assim as células num processo lento e gradual tornam-se malignas. Têm-se início a expansão dos clones destas células sob a ação dos oncogênicos. A suspensão desses agentes pode, eventualmente, interromper a transformação das células iniciadas em malignas. Substâncias presentes nos alimentos, exposição excessiva e prolongada a hormônios, são exemplos de fatores que podem promover essa transformação. Nos casos em que não ocorrem a interrupção têm-se a progressão onde ocorrerá as primeiras manifestações clínicas, pois, as células descontroladamente se multiplicam levando a formação de um tumor (aumento de volume) tornando possível seu diagnóstico (ABEL et al., 2009; INCA, 2013).

2.1.2 Carcinoma de Pulmão e sua importância epidemiológica

Entre os cânceres, os mais comuns em seres humanos são os carcinomas. É denominado carcinoma, devido a sua origem que se dá a partir do tecido epitelial. Entre os carcinomas, os de pulmão são os mais prevalentes em todo o mundo, correspondendo a aproximadamente 15% de todos, apresentam elevada taxa de mortalidade e a taxa de sobrevivência em cinco anos é inferior a 15% (ETTINGER, 2012). A incidência deste carcinoma na população brasileira, foi de 27.330 casos no ano de 2014 a mesma incidência foi válida para o ano 2015 (BRASIL, 2014).

Entre os cânceres de pulmão, os tipos mais comuns são originados das células epiteliais e por isso são denominados carcinomas. Classificando-o histologicamente os mais comuns são dois principais grupos de carcinomas de pulmão: Carcinoma de Pulmão de Células Pequena (CPCP) e Carcinoma de Pulmão de Células Não-Pequenas (CPCNP). Os CPCNP correspondem a cerca de 85% a 90% dos cânceres de pulmão, e apresentam os seguintes subtipos: Carcinoma de células escamosas (Epidermóide), adenocarcinomas, carcinoma de grandes células e outros subtipos que apresentam menor incidência (SANTOS, 2013).

2.1.3 Terapias convencionais para o tratamento do câncer

Os tratamentos disponíveis e mais utilizados para o câncer são a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia e a remoção cirúrgica do tumor (INCA, 2012). Radioterapia e quimioterapia são terapias eficientes, mas causam muitos efeitos colaterais de curto e longo prazo, incluindo complicações cardiovasculares (MAUREA, 2010). Os agentes antineoplásicos mais empregados na quimioterapia incluem os alquilantes polifuncionais como a mostarda nitrogenada, as nitrosuréias, a ciclofosfamida, a cisplatina e o bussulfan; os antimetabólitos como a 6-mercaptopurina, o 5-fluoruracil e o metotrexato; os antibióticos antitumorais como a mitomicina C, a actinomicina D, a daunorrubicina, doxorrubicina e a adriamicina; os inibidores mitóticos como a vincristina, vimblastina e o etoposídeo e outros agentes não agrupados em uma classe farmacológica específica, como a dacarbazina e a L-asparaginase (INCA, 2012). A maioria dos agentes terapêuticos antitumorais, tais como paclitaxel, doxorrubicina, capecitabina, ciclofosfamida e vinflunina, destroem as células cancerosas, inibindo a síntese de DNA (SAIF, 2008; VUJASVOVIC, 2010).

O tratamento adequado para os carcinomas depende do tipo, da localização e do estágio clínico da doença. Para o tratamento de carcinomas em estágio inicial é a ressecção cirúrgica com margens livres, este procedimento aumenta as chances de cura. A radioterapia e a quimioterapia, podem ser aplicadas separadamente ou em conjunto e geralmente são aplicadas antes da remoção cirúrgica, com o objetivo de redução do seu tamanho ou como tratamento da doença (SANTOS, 2013).

Alguns carcinomas, entre eles, o de pulmão têm apresentado resistência a múltiplas drogas, o que reduz a eficiência a resposta à quimioterapia. Entre as drogas de predileção para o tratamento de carcinomas tem-se a doxorrubicina que é um antibiótico da família das antraciclinas, grupo de compostos que se encontra entre os agentes antineoplásicos mais usados no tratamento de uma ampla variedade de tumores sólidos incluindo os carcinomas de pulmão (SILVA et al., 2012).

Estudos revelam que as antraciclinas apresentam três mecanismos de ação: ligações com os grupos de fosfolípídeos (carregados negativamente) da membrana celular, alterando desta forma sua fluidez, além dos transportes de íons; formação do radical livre do oxigênio e da semiquinona, através de um processo redutor enzimático e bloqueio da síntese do DNA e RNA através da formação de ligações interfilamentares com o DNA, promovendo assim a ruptura dos filamentos de suas moléculas. A doxorrubicina e a daunorrubicina (figura 2) foram aprovadas pela “FDA – *Food and Drug Administration*” para uso geral em casos de câncer (Salmon, 1998). Apesar da vasta gama de compostos disponíveis para o tratamento de diversos tipos de cânceres, a resistência aos quimioterápicos é um fator verídico em alguns tipos de carcinomas devido ao fato da adaptação e do desenvolvimento de novos mecanismos de invasão encontrados por estas células quando expostas ao tratamento (CARVALHO, 2014). Um desafio importante é a concepção de novas substâncias químicas altamente seletivas para as células cancerosas de modo a minimizar os efeitos colaterais (DUTT & MADAN, 2013). Desta forma, existe a necessidade cada vez maior pela busca de novas terapias com maior eficácia e poucos efeitos colaterais se fazem necessárias (JANJETOVIC et al., 2011).

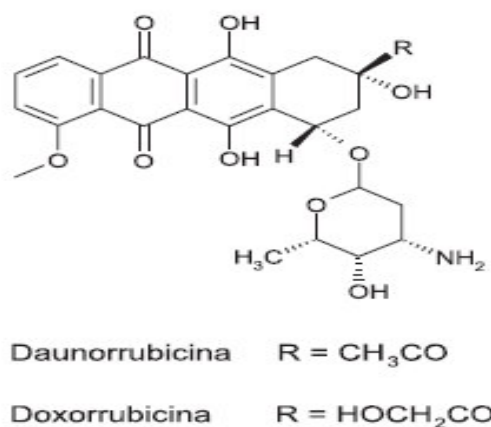


Figura 1: Estruturas da Daunorubicina e Doxorubicina.

2.1.4 Produtos Naturais

Pesquisas relacionadas aos produtos naturais tornaram-se cada vez mais frequentes no universo científico, especialmente no que confere a plantas e micro-organismos. No campo da oncologia, estudos demonstraram a eficiência destes produtos para o tratamento de diversos carcinomas, pois, boa parte dos quimioterápicos introduzidos na terapêutica anticâncer têm sua origem a partir dos produtos naturais (HARVEY, 2008).

As plantas medicinais são popularmente utilizadas em todo mundo, e tem sido alvo de estudos, com base em seu amplo uso terapêutico, concentrando-se principalmente em suas composições fitoquímicas dos extratos vegetais. A identificação de tais produtos naturais é de extrema importância, todavia, podem levar ao desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos (RIBEIRO et al., 2014; MELO et al., 2013).

Aproximadamente 70% das substâncias antitumorais conhecidas são derivadas de produtos naturais (KARIKAS, 2010). Estes, são uma das fontes mais ricas na obtenção de substâncias eficazes na quimioterapia (CURT, 1996). Substâncias naturais ou sintéticas obtidas a partir de produtos naturais utilizadas de forma isolada ou combinadas a outras terapias emergiram como fontes promissoras na redução do risco de câncer (CHATUVERDI et al., 2008).

Substâncias de origem vegetal têm apresentado elevado potencial quimiopreventivo, esta característica está relacionada à grande variabilidade de efeitos biológicos induzidos por esses compostos, que apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, reguladora do sistema imune e hormonal, a supressão da proliferação celular e da angiogênese e a indução da apoptose (PRATHEESHKUMAR et al., 2012).

Alguns produtos derivados de plantas medicinais tais como os óleos essenciais, são obtidos a partir de folhas, cascas, sementes entre outras partes de plantas (LIOLIOS et al., 2009). Os óleos essenciais pertencem ao metabolismo secundário das plantas e constituem um dos mais importantes grupos de matéria prima para diversas áreas, entre estas a indústria farmacêutica. São misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídas, em sua maioria, por moléculas de natureza terpênica (MORAIS, 2012) e de outras propriedades químicas (GOMES et al., 2011).

2.1.4.1 Plantas do gênero *Lippia*

A planta do gênero *Lippia* apresenta cerca de 250 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, distribuídos entre os países da América do Sul e Central e pela África tropical. Aproximadamente 120 espécies deste gênero são encontradas no Brasil. Algumas

espécies de *Lippia* caracterizam-se por produzirem óleos essenciais que apresentam atividade antimicrobiana devido a presença de monoterpenos como timol e carvacrol (AGUIAR e COSTA, 2005; BOTELHO, 2007). Os óleos essenciais destas plantas podem ser extraídos de diversas partes da mesma, possuem atividade antimicrobiana comprovada em algumas espécies como a *Lippia sidoides* e a *Lippia gracilis* (RIBEIRO et al., 2014; MELO et al., 2014).

Os constituintes majoritários dessas plantas são o timol, carvacrol, geranial, linalol, p-cimeno, carvona, neral, limoneno, β -cariofileno, óxido cariofileno, mirceno e γ -terpineno. Todavia, as concentrações de tais constituintes podem variar em função de fatores abióticos, além de fatores genéticos. Os fatores abióticos atuam no rendimento e composição dos óleos essenciais que podem sofrer influências da sazonalidade, disponibilidade de água, luz, temperatura, estágio de desenvolvimento da planta e seu estado nutricional (BEZERRA et al., 2011).

Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando principalmente *L. alba*, *L. sidoides*, *L. organoides* e *L. gracilis* comprovaram atividade antimicrobiana, antiparasitária, antiinflamatória, analgésica, anestésica e antitumoral em animais, indicando grande potencial dessas espécies para uso na medicina e na veterinária uma vez que algumas espécies de *Lippia* estão sendo utilizadas também na aquicultura (SOARES e DIAS, 2013).

2.1.4.1.1 *Lippia gracilis* Schauer

Lippia gracilis Schauer é uma planta nativa do nordeste brasileiro encontrada, principalmente, nos estados da Bahia, Sergipe e Piauí. No sertão nordestino, é popularmente conhecida como cidreira da serra; enquanto no Agreste é conhecida popularmente como alecrim-da-chapada ou alecrim-de-tabuleiro (LORENZI, 2008). Entre as suas utilizações medicinais populares, estão o tratamento de doenças cutâneas, queimaduras, feridas e úlceras. Além disso, seu uso no tratamento da gripe, tosse, sinusite, bronquite, obstrução nasal, dor de cabeça, icterícia e paralisia tem sido relatado (PASCUAL et al., 2001 e ALBUQUERQUE et al., 2007).

Esta espécie de *Lippia* apresenta variada composição química, com elevadas concentrações de substâncias como timol e carvacrol. Apresenta vários genótipos, sendo os mais estudados LG-106, LG-107, LG-108, LG-109, LG-110, LG-201 E LG-202 (SANTOS et al., 2016).

A diversidade química entre estes genótipos explica as diferentes ações apresentadas pelos óleos essenciais. Melo e seus colaboradores (2014) avaliaram o efeito citotóxico do óleo essencial de diferentes genótipos de *lippia gracilis* frente as células tumorais, neste estudo foram encontrados valores elevados de LC 50 (concentração letal para 50% das células). Da mesma forma Ribeiro et al (2012) relatou em sua pesquisa que este óleo apresenta efeito citotóxico frente a linhagens tumorais.

Segundo Guilhon e seus colaboradores (2011), plantas desta espécie apresentam atividades antimicrobiana, antisséptica e anti-inflamatória. Além disso estudos realizados por outros autores demonstram atividade larvicida e ação contra o mosquito *Aedes aegypti* (Silva et al., 2008).

2.1.4.1.2 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown é uma planta medicinal nativa da América do Sul cujos óleos essenciais apresentam grande variabilidade química e exibe propriedades terapêuticas. É uma planta aromática que cresce na África e na América Latina, muito utilizada nos preparos de infusão de alívio imediato. Na Colômbia é popularmente conhecida como "orégano Hill", onde são utilizadas para diversos fins medicinais (PASCUAL et al., 2001; OLIVEIRA et al . 2006). Esta planta apresenta diversos nomes populares no Brasil como chá-de-tabuleiro, cidrila, erva-cidreira-de-arbusto, alecrim-selvagem, cidreira-brava,

falsa-melissa, erva-cidreira, erva-cidreira-brasileira, erva-cidreira-do-campo, cidreira carmelitana, salva, salvado-brasil, salva-limão, alecrim-do-campo, salva-brava, sávia (TAVARES et al., 2005).

Esta espécie é um subarbusto que apresenta forma variável com ramos finos esbranquiçados, arqueados, longos e quebradiços. As folhas são inteiras, opostas, de bordos serrados e ápice agudo, de 3-6 cm de comprimento. As flores são azul-arroxeadas, reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável. Os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas (LORENZI et al., 2004).

Óleos essenciais extraídos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown apresentam uma elevada composição química, o que sugere, desta forma, a existência de quimiotipos (HENNEBELLE et al., 2008). Monoterpenos tais como limoneno, carvona, citral, β -cariofileno, tag-etenone, mirceno, γ -terpinene, cânfora, 1,8-cineol e estragole são frequentemente encontrados nesses óleos essenciais (HENNEBELLE et al., 2006).

Sua variabilidade química permite que óleos desta planta apresentem diversas atividades como analgésica, anti-inflamatória, antipirética, sedativa. Além disso, são utilizados em casos de diarreia, doenças da pele, perturbações gastrointestinais, doenças do fígado, doenças do trato respiratório, além de algumas doenças sexualmente transmissíveis como sífilis e gonorréia (PASCUAL et al., 2001). Sua ampla atividade terapêutica a torna uma planta promissora para as indústrias farmacêuticas, de aromáticos e perfumes, além das indústrias de produtos agrícolas, devido as suas propriedades antifúngica, inseticida e como repelente (YAMAMOTO et al., 2008).

2.1.4.1.3 *Lippia sidoides* Cham.

Planta comumente conhecida como alecrim pimenta, é um subarbusto, densamente modificado de até 2 metros de altura, com tronco apresentando até 8 cm de diâmetro, casca sulcada, frágil e que se quebra facilmente, encontrado no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. A exemplo de outras plantas do gênero, *Lippia sidoides* Cham. é uma planta aromática, de uso medicinal popular, principalmente como anti-séptico (MATOS e OLIVEIRA, 1998).

Além de ser considerada um poderoso anti-séptico e germicida natural, devido ao timol presente, esta planta apresenta um odor mais aprazível que aquelas ricas em ácido carbólico ou fenol comum (Mendonça, 1997). Este possui elevado valor comercial, devido a presença do timol ou uma mistura de timol e carvacrol, dois terpenos fenólicos isoméricos com fortíssima propriedade antimicrobiana e anti-séptica (MATOS, 2000). Além destes, outros compostos comumente encontrados nos óleos essenciais de *L. sidoides* são o α -felandreno, α -cimeno e mirceno (LOBO et al., 2011; COSTA et al. 2005; SOUZA et al., 2008).

Timol apresenta-se como um líquido cristalino, de odor forte, que apresenta uma estrutura química similar ao carvacrol, com o diferencial da localização do grupo hidroxila no anel fenólico. Já o carvacrol apresenta-se como um líquido amarelo-claro, também de odor forte e com elevado potencial farmacológico frente as leveduras, fungos, bactérias Gram + e Gram -, os dois principais constituintes da *Lippia sidoides* são de natureza monoterpénóides e isômeros, apresentando grande perspectiva de substituir os antibióticos (BARROSO, 2010).

O potencial inibitório dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* obtidos de plantas desta espécie foi demonstrado em bactérias e fungos do gênero *Candida*, além de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (RONDON et al., 2012). Efeito dose-dependente do timol em óleo essencial de *L. sidoides*, também foi observado na eclosão de ovos e larvas de *Haemonchus contortus*, *Syphaciaob velata* e *Aspiculuris tetraptera*, nematoides comuns em pequenos ruminantes, conforme relatado por Camurça-Vasconcelos et al. (2007). Além disso, trabalhos têm evidenciado o potencial inibitório dos óleos essenciais de *Lippia* sobre diversos tipos de células tumorais como demonstrados por Gomide e colaboradores (2013), quando da utilização dos óleos frente as células tumorais CT26 e A549.

Desta forma, estudos evidenciam a capacidade antiproliferativa e citotóxica dos óleos essenciais de *L. gracilis*, *L. sidoides* e *L. alba* frente às bactérias, fungos, parasitos, linhagens de células tumorais, entre outras atividades. O que torna os óleos produzidos por esta planta uma terapia auxiliar promissora para os diversos tipos de carcinomas que possam acometer o organismo.

3. CONCLUSÕES GERAIS

- Diante da diversidade dos produtos naturais, inúmeros são os que apresentam atividade antitumoral, entre eles os óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia*;
- Várias pesquisas destacam-se pelo uso dos óleos essenciais de diversas espécies de *Lippia* e de diferentes genótipos por estes apresentam atividade antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, ação contra o *Aedes aegypti*, além da atividade citotóxica frente a alguns tipos de tumores, desta forma apresentando atividade antitumoral.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E.L.; ANGEL, J. M.; KIGUCHI, K.; DIGIOVANNI, J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin; Fundamentals and applications. **Nature Protocols**, v.4, n.9, p. 1350-1362, 2009.

AGUIAR, J.S. e COSTA, M.C.C.D., *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae): Levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 8, 79–84. 2005.

ALBUQUERQUE, U.P., MEDEIROS, P.M., ALMEIDA, A.L.S., MONTEIRO, J.M., Lins Neto, E.M.F., MELO, J.G., SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, 325–354, 2007.

BAKALLI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. Biological effects of Essentials oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 36, n.2, p. 446-475, 2008.

BARROSO, J. A. Atividade do carvacrol e timol in vivo na inibição de *Streptococcus mutans* e experiência de cárie em crianças livres de cárie: um estudo longitudinal. 2010. 206f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 2010.

BEZERRA, F. N. R.; ROLIM, R. R.; SANTOS, H. R.; MARCO, C. A.; FEITOSA, J. V.; COSTA, A. N. L. Rendimento do óleo essencial de cidreira brava (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. em diferentes horários de corte. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C.; BRAZ, J. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens **Med. Biol.** v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [homepage on the Internet]. Rio de Janeiro: INCA [Estimativas 2014: Incidência de câncer no Brasil. Acessado em março de 2015 <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.asp>

BRESSAN, Jaqueline. **Constituintes químicos, atividade antioxidante e citotóxica das partes aéreas de *Baccharis burchellii* Baker (Asteraceae)**. Curitiba: UFP, 2014. 109 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288-294, 2007.

CARVALHO DE, José Renildo. **Identificação e Caracterização das Células do Sistema Imune Presentes no Microambiente Tumoral em Modelo de Melanoma Murino**. São Paulo: UNIP, 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Ambiental e Experimental) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, 2014.

CHATURVEDI, P.K; BHUI, K; SHUKLA, Y. Lupeol: connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263, p. 1-13, 2008.

CHEN, W.; ARMSTRONG B. K.; ZHENG R.; ZHANG S.; YU X.; CLEMENTS M. Cancer burden in China: a Bayesian approach. **BMC Cancer**, v. 13, p. 458, 2013.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H., LEMOS, T.L.G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiussii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v 15, p. 304-309, 2005.

CUI, Q.; YU, J.; WU, J.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; MINAMI, M.; IKEJIMA, T. P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3-independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, p. 1057-1066, 2007.

CURT, G.A. Cancer Drug Development: New Targets for Cancer Treatment. **The Oncologist**, v. 1, p. 2 - 3, 1996.

EDGE, S. B.; BYRD, D. R.; COMPTON, C. C.; FRITZ, A. G.; GREENE, F. L.; TROTTI, A. American Joint Committee on Cancer . American Cancer Society. **AJCC Cancer Staging Handbook: From the AJCC Cancer Staging Manual**. **Springer: New York**, v. 19, p. 718, 2010.

ETTINGER, D.S. Lung cancer and other pulmonary neoplasms. **Goldman's Cecil Medicine**. Elsevier. 24 th ed., vol 2, p. 1264-71. New York, 2012.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GOMIDE, M.S.; LEMOSH, F. de O.; LOPESB, M.T.P.; ALVESC, T.M.de A.; VICCINIA, C.M.C.; COELHO, C.M. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, n. 6, p. 895-902, 2013.

GOMPEL, A. et al. Oncology in medilife and beyond. **Climateric**, v. 16, p. 522–535, 2013.

GUILHON, C. C.; RAYMUNDO, L. J., ALVIANO, D. S., BLANK, A. F., ARRIGONI-BLANK, M. F., MATHEUS, M. E., FERNANDES, P.D.; SÓCRATES, C.H.; CELUTA, A. F. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology** v. 135, n. 2, p. 406-413, 2011.

HANAHAN, D; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HARVEY, A. L.; Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, **25**, 475-516, 2008.

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.

HUSSAIN, S.A; SULLIVAN, R. Cancer control in Bangladesh. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. 43(12)1159– 1169, 2013.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Incidência do Câncer no Brasil 2012. **Ministério da Saúde**, 2012.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Incidência do Câncer no Brasil 2013. **Ministério da Saúde**, 2013.

KARIKAS, G.A. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. **Journal of B.U.ON: official journal of the Balkan Union of Oncology**. v. 15 (4), p. 627–638, 2010.

LIOLIOS, C.C.; GORTZI, O.; LALAS, S.; TSAKNIS, J.; CHINOI, I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry** 112, 77–83, 2009.

LOBO, P. L. D.; FONTELES, C. S. R.; CARVALHO, C. B. M.; NASCIMENTO, D. F.; FONSECA, S. G. C.; JAMACARU, F. V. F.; MORAES, M. E. A. Dose-response evaluation of a novel essential oil against Mutans streptococci in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 551–556, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: **Instituto Plantarum**. 512 p, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. **Plantarum: Nova Odessa**, 2ª ed., p. 527, 2008.

MATOS, FJA. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: **UFC**. 344 p. 2000.

MATOS F.J de A; OLIVEIRA F. de. *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. Revista Brasileira de Farmacologia 79 (3/4): 84-87, 1998.

MAUREA N, COPPOLA C, RAGONE G, FRASCI G, BONELLI A, ROMANO C, et al. Women survive breast cancer but fall victim to heart failure: The shadows and lights of targeted therapy. **J Cardiovasc Med (Hagerstown)** v 11(12), p 861-8, 2010.

MELO, J.O.; BITENCOURT, T.A.; FACHINB, A.L.; CRUZA, E.M.O.; JESUS, H.C.R.; ALVES, P.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; FRANCA, S.C.; BELEBONI, R.O.; FERNANDES, R.P.M.; BLANK, A.F.; SCHER, R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica** 128, 110–115, 2013.

MELO, J. O.; FACHIN, A.L.; RIZO, W.F.; JESUS, H.C.R.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; ALVES, P.B.; MARINS, M.A.; FRANÇA, S.C.; BLANK, A.F. Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. **Genetics and Molecular Research** 13 (2): 2691-2697, 2014.

MENDONÇA, M. C. S. **Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Ceará, 1997.

MORAIS, S. R.; OLIVEIRA, T. L. S.; BARA, M. T. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; REZENDE, M. H.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; Chemical Constituents of Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) Leaves Cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. **International Journal of Analytical Chemistry**, doi: 10.1155/2012/363919, 2012.

OLIVEIRA, D.R.; LEITAO, G.G.; SANTOS, S.S.; BIZZO, D.H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; LEITÃO, S.G.; Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil. **J Ethnopharmacol** 108: 103-108. Paik SY, Koh KH, Beak, 2006.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ, M. D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology** 76, 201–214, 2001.

PRADO, B. B. F. do. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Cienc. Cult.** vol.66, n.1, pp. 21-24. ISSN 2317-6660, 2014.

PRATHEESHKUMAR, P.; SREEKALA, C.; ZHANG, Z.; BUDHRAJA, A.; DING, S.; SON, Y.O.K.; WANG, X.; HITRON, A.; HYUN-JUNG, K.; WANG, L.; LEE, J-C.; SHI, X. Cancer prevention with promising natural products: mechanisms of action and molecular targets. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1159-1184, 2012.

RIBEIRO, T.G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; VALADARES, D.G.; FRANCA, J.R.; LAGE, P.S.; DUARTE, M.C.; ANDRADE, P.H.R.; MARTINS, V.T.; COSTA, L.E.; ARRUDA, A.L.A.; FARACO, A.A.G.; COELHO, E.A.F., CASTILHO, R.O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, V. 143, p. 60–68 2014.

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M.; ANDRADE-JÚNIOR, H. F.; CARVALHO, C. A.; LIMA, J. C.; MAGALHÃES, H. C. R. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 185-191, 2012.

RUDDON, R. Cancer Biology. **Oxford University Press**, 4th ed. New York, 2007.

RUFINI, A.; MELINO, G. Cell death pathology: The war against cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications** V. 414, Issue 3, Pages 445–450, 2011.

SAIF MW, TOMITA M, LEDBETTER L, DIASIO RB. Capecitabine-related cardiotoxicity: Recognition and management. **J Support Oncol**, v. 6, p 41-48, 2008.

SALMONM, S.E. Em **Farmacología Básica e Clínica**, Katzung, B.G., ed. Guanabara Koogan S.A, p. 629-655, Rio de Janeiro, 1998.

SANTOS, M. S. C. **Citotoxicidade Induzida Por Nanoemulsoes De Selol Em Células De Adenocarcinoma De Pulmao Humano**. 79f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília – DF, 2013.

SANTOS, C.P. dos.; PINTO, J. A. O.; SANTOS, C.A. dos.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, M. de F. A.; ANDRADE, T.M.; SANTOS, D. de A.; ALVES, P.B.; BLANK, A. F.; Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**. V. 79, p. 205-210, 2016.

SILVA, W.J.; DORIA, G.A.; MAIA, R.T.; NUNES, R.S.; CARVALHO, G.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; MARCAL, R.M.; CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresour. Technol.** 99: 3251-3255, 2008.

SILVA, Joana Filipa Pires. **Caracterização do potencial citotóxico e mecanismos de acção de um complexo de platina de configuração trans em células animais**. Lisboa: Universidade Nova De Lisboa Faculdade De Ciências, 115f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina). Programa de Pós-Graduação Departamento de Ciências da Vida. Universidade Nova De Lisboa, 2012.

SOARES, B.V.; DIAS, M.T. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Macapá**, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOUZA, E. M. **Seleção, comportamento fenotípico e genotípico e desenvolvimento de uma nova cultivar de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) para Sergipe**. São Cristóvão: UFS, 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Sergipe, 2008.

TAVARES E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15 (1): 1-5, 2005.

THONGPRASERT, S.; PERMSUWAN, U.; RUENGORN, C.; CHAROENTUM, C.; CHEWASKULYONG, B.; Cost effectiveness analysis of cisplatin plus etoposide and carboplatin plus paclitaxel in a phase III randomized trial for non-small cell lung cancer. **Asia Pac Journal of Clinical Oncology**. V. 7(4):369-75, 2011.

VUJASKOVIC, Z.; KIM, D.W.; JONES, E.; LAN, L.; MCCALL, L.; DEWHIRST, M.W.; CRACIUNESCU, O.; STAUFFER, P.; LIOTCHEVA, V.; BETOF, A.; BLACKWELL, K. A phase I/II study of neoadjuvant liposomal doxorubicin, paclitaxel, and hyperthermia in locally advanced breast cancer. **International Journal of Hyperthermia**. v.26, p 514- 521, 2010.

YAMAMOTO, P.Y.; COLOMBO, C.A.; AZEVEDO FILHO, J.A.; LOURENÇÃO, A.L.; MARQUES, M.O.M.; MORAIS, G.D.S.; CHIORATO, A.F.; MARTINS, A.L.M.; SIQUEIRA, W.J. Performance of ginger Grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Scientia Agricola**, 65 (5): 481-489, 2008.

ZHANG, J.Y. et al Quercetin Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway in KB and KBv200 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013

5. ARTIGO 1: ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA* SPP. FRENTE A CÉLULAS DA LINHAGEM A549 DE CARCINOMA DE PULMÃO HUMANO

Periódico a ser submetido na revista “Acta Tropica”

RESUMO

Produtos naturais derivados de plantas têm sido estudados para utilização no desenvolvimento de quimioterápicos empregados no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo os carcinomas de pulmão. Nesse contexto, inserem-se os óleos essenciais produzidos por plantas do gênero *Lippia* que apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antiproliferativa, entre outras. A análise por CG-EM dos óleos essenciais das três espécies de *Lippia* permitiu identificar a predominância do monoterpene carvacrol nos genótipos de *L. gracilis* 110 (LG-110) e *L. sidoides* 104 (LS-104) e timol nos genótipos de *L. gracilis* 106 (LG-106) e *L. sidoides* 102 (LS-102). Carvona e Limoneno foram os monoterpenos majoritários nos dois genótipos de *Lippia alba* (LA-13 e LA-57). A citotoxicidade destes óleos essenciais frente a células de carcinoma de pulmão (A549) foi determinada através do método colorimétrico do MTT. Uma ação dose dependente sobre a viabilidade celular foi observada em todos os óleos avaliados. Valores de IC₅₀ de 75,42 e 158,6 µg/mL foram obtidos para os genótipos LG-106 e LG-110, respectivamente. Para os genótipos LS-102 e LS-104 as IC₅₀ foram, respectivamente, 97,93 e 150,70 µg/mL e para os genótipos LA-13 e LA-57 estes valores foram 86,14 e 70,34 µg/mL. A análise microscópica das células coradas por hematoxilina-eosina revelou alterações morfológicas incluindo condensação do citoplasma, condensação da cromatina e a fragmentação nuclear induzidas por todos os genótipos avaliados. Estes resultados sugerem que atividade citotóxica apresentada pelos óleos essenciais de *Lippia* sobre células da linhagem A549 envolve a indução de morte celular programada. Com isso, conclui-se que tais óleos representam um fonte promissora de compostos para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais.

Palavras chave: Câncer de pulmão, óleo essencial, *Lippia gracilis*, *Lippia sidoides*, *Lippia alba*.

ABSTRACT

Natural products derived from plants have been studied for the development of chemotherapeutic agents to be used in the treatment of various cancers, including lung carcinomas. The essential oils produced by plants of the genus *Lippia* which exhibit antimicrobial, anti-inflammatory and antiproliferative properties, appear as potential sources of compounds displaying anticancer properties. The analysis by CG-EM of the essential oils of three species of *Lippia* allowed identify the predominance of monoterpene carvacrol in the genotypes of *L. gracilis* 110 (LG-110) and *L. sidoides* 104 (LS-104) and thymol in *L. Genotypes gracilis* 106 (LG-106) and *L. sidoides* 102 (LS-102). Carvone and limonene were the main monoterpenes in two genotypes of *Lippia alba* (LA-13 and LA-57). The cytotoxicity of these essential oils against lung carcinoma cells (A549) was determined by the MTT colorimetric method. A dose-dependent action on cell viability was observed in all oils evaluated. IC₅₀ values of 75.42 and 158.6 ug / ml were obtained for the LG-106 and LG-110 genotypes, respectively. For LS-102 and LS-104 genotypes, the IC₅₀ were respectively 97.93 and 150.70 mg / mL and for LA-13 and LA-57 genotypes these values were 86.14 and 70.34 mg / mL, respectively. Microscopic analysis of cells stained by hematoxylin-eosin showed morphological changes, including cytoplasm and chromatin condensation and nuclear fragmentation induced in all genotypes evaluated. These results suggest that the cytotoxic activity presented by the essential oils of *Lippia* on A549 lineage cells involves induction of programmed cell death. Therefore, it is concluded that these oils represent a promising source of compounds for the development of new anti-tumor therapies.

Keywords: Lung cancer, essential oil, *Lippia gracilis*, *Lippia sidoides*, *Lippia alba*

5.1. Introdução

Câncer refere-se à multiplicação desordenada e anormal de células que sofreram mutação e que tem a capacidade de invadir outros tecidos e órgãos de outra origem que não o seu (INCA, 2013). As células tumorais caracterizam-se por apresentarem crescimento e espalhamento descontrolado, que ocorrem devido a múltiplas alterações na expressão gênica levando a proliferação e morte celular (TARVER, 2012). É um importante problema de saúde pública e representa uma das principais causas de mortalidade no mundo (CHEN et al., 2013; GOMPEL et al., 2013; HUSSAIN e SULLIVAN, 2013).

Entre os tipos de cânceres de maior incidência encontram-se os carcinomas de pulmão que integram uma das principais causas de morte por câncer, revelando uma incidência de 2% ao ano em todo o mundo (INCA, 2013). Histologicamente são classificados em: carcinoma de pulmão de pequenas células (CPCP) e carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP), segundo LNSCO (2011).

O maior número de casos de carcinoma de pulmão é diagnosticado tardiamente e desta forma encontra-se em estágios avançados da doença. O diagnóstico precoce está diretamente relacionado a sobrevida (INCA, 2012). Para os casos que apresentam diagnóstico em estágio inicial a remoção cirúrgica pode aumentar as chances de cura (SANTOS, 2013). O tratamento adequado para este e outros tipos de carcinomas depende do tipo, da localização e de seu estágio clínico. A padronização terapêutica atual para os carcinomas de pulmão localmente avançado se dá através da radioterapia associada à quimioterapia, utilizadas concomitantemente durante aproximadamente 45 dias (AUPERIN et al, 2010).

Muitos quimioterápicos têm sido testados e apresentam avanços no tratamento para os CPCP e os CPCNP. Dentre estes, o uso de drogas a base de platina como cisplatina, oxiplatina e diplatina é a terapêutica preconizada e a mais recomendada. Todavia, as taxas de resposta são de 20 a 40%. A resistência aos quimioterápicos é um fator verídico em alguns tipos de carcinomas devido ao fato da adaptação e do desenvolvimento de novos mecanismos

de invasão encontrados por estas células quando expostas ao tratamento (CARVALHO, 2014).

Nesse contexto, uma alternativa viável às drogas convencionais para o tratamento do câncer é a utilização de produtos naturais como os óleos essenciais. Estes contêm uma rica mistura de moléculas altamente funcionais, que apresentam elevado potencial terapêutico, incluindo ação sobre a viabilidade de células tumorais (PARCK et al., 2011).

Plantas do gênero *Lippia* (Verbenaceae) possuem ampla distribuição geográfica e são facilmente encontradas em países tropicais. O gênero apresenta aproximadamente 200 espécies, sendo as mais incidentes no Brasil a *Lippia alba* Mill, *Lippia gracilis* Schauer, *Lippia grandis* Schau, *Lippia origanoides* Kunth, *Lippia sidoides* Cham e *Lippia triplinervis* Gardner.

Há algum tempo, extratos e óleos essenciais obtidos de *Lippia spp.* têm sido destaque em pesquisas científicas devido ao potencial dos seus princípios bioativos (GOMES et al., 2011). Pesquisas realizadas demonstraram que os principais constituintes do óleo essencial de *Lippia*, são: timol, carvacrol, geraniol, linalol, p-cimeno, carvona, neral, limoneno, β -cariofileno, mirceno e γ -terpineno. Estudos baseados nas propriedades farmacológicas de espécies deste gênero demonstraram que o óleo essencial extraído de suas folhas apresenta atividades analgésica, anestésica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral (SOARES e DIAS, 2013). A ação citotóxica do óleo essencial de *Lippia* já foi demonstrada em várias linhagens tumorais como em linhagens de hepatocarcinoma (HepG2) (FERRAZ et al., 2013), linhagem A549 de carcinoma de pulmão (GOMIDE et al., 2013) e linhagem de câncer de mama (PATEL e THAKKAR, 2014).

Portanto, produtos obtidos dessas plantas são recursos promissores, tornando-se desta forma objeto de estudo para desenvolvimento de terapias alternativas para patologias que acometem o homem incluindo o câncer. Assim sendo, no presente estudo a composição química de diferentes genótipos de *Lippia gracilis*, *L. sidoides* e *L. alba* foi caracterizada por GC-MS. A atividade citotóxica dos mesmos foi evidenciada e as alterações morfológicas produzidas indicam que seus mecanismos de ação em células A549 envolvem processos apoptóticos.

5.2. Material e Métodos

5.2.1 Plantas

As folhas dos genótipos de *L. gracilis* Schauer, LG-106, LG-110, de *Lippia sidoides* LS-104 e LS-102 e de *Lippia alba* LA-57 e LA-13, foram coletadas no banco de germoplasma da Universidade Federal de Sergipe, localizado no campus rural da UFS localizado em São Cristovão-SE, Brasil, numa latitude 11° 00' S e longitude 37° 12' W, de acordo com a tabela 1.

5.2.2 Extração do óleo essencial

As plantas foram cortadas a uma altura de 30 cm do solo, e as folhas foram submetidas ao processo de secagem numa incubadora com fluxo de ar forçado a uma temperatura de 40° C durante cinco dias. Após a secagem, as folhas foram pesadas em balança eletrônica, e os óleos essenciais foram extraídos utilizando o método de hidrodestilação em Clevenger. Para hidrodestilação, 75 g de folhas secas e 2,0 L de água destilada foram utilizados por recipiente e o período de destilação foi de 120 minutos após o início de condensação do vapor de água no aparelho de Clevenger. Após extração, os óleos essenciais foram recolhidas e armazenados no congelador em frascos de vidro âmbar.

Para a utilização dos óleos nos ensaios de citotoxicidade, os mesmos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração final de 160 mg/mL. As concentrações de trabalho foram obtidas a partir da diluição desta solução em meio DMEM (Dulbeccos's

Modified Eagle Medium) (Life Technologies, Gibco-BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA) e 2% de antibióticos Penicilina – Estreptomicina (Sigma).

TABELA 1: Genótipos de *Lippia gracilis* coletados no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe.

Código	Local De Origem	Nome Científico	Nº Exsicata Herbário UFS
			14733
LG-106	Tomar do Geru – SE	<i>L. gracilis</i>	14732
LG-110	Tomar do Geru – SE	<i>L. gracilis</i>	
LSD-102	Poço Redondo – SE	<i>L. sidoides</i>	8224
LSD-104	Poço Redondo – SE	<i>L. sidoides</i>	8226
LA-13	Fortaleza – CE	<i>L. alba</i>	13488
LA-57	Rio Real – BA	<i>L. alba</i>	13469

5.2.3 Análise Química

A análise qualitativa da composição química do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo de gás acoplado a espectrômetro de massa (GC-MS, 5050A modelo QP, Shimadzu) equipado com um amostrador automático COA-20i (Shimadzu) e uma coluna capilar de sílica fundida (5% fenilo, 95% de dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm DI, espessura da película e de 0,25 μ m, J & W Scientific) usando hélio como gás transportador, a um caudal de 1,2 mL min⁻¹. A rampa de temperatura foi de 50 ° C durante 2 min, seguido de um aumento de 4 ° C min até alcançar 200 ° C, e em seguida, um aumento de 15 ° C até atingir 300 ° C. Após isso a temperatura foi mantida constante durante 15 min. A temperatura do injetor foi mantida a 250 ° C, e a do detector (ou interface) foi mantida a 280 ° C. Um volume de 0,5 μ l foi injetado usando acetato de etila. A taxa de partição do volume injetado foi de 1: 100, e a pressão da coluna foi de 64,20 kPa. As condições de espectrometria de massa (SM) (foram como se segue: detector de energia de impacto, 70 eV para captura iônica; velocidade de digitalização, 0,85 leituras / s; e gama, de 40 a 550 Da.

Os constituintes químicos foram quantificados por Cromatografia Gasosa (CG) com detector de ionização de chama usando um sistema Shimadzu GC-17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um ZB-5MS (5% de fenil-arileno / 95% de dimetilpolissiloxano) fundido coluna capilar de sílica (30 m x 0,25 mm de espessura de película de DI x 0,25 mm) da Phenomenex (Torrance, CA, EUA) sob as mesmas condições descritas para CG-SM. A quantidade de cada componente foi determinada pela normalização de área (%). As concentrações foram calculadas a partir das áreas dos picos de CG e dispostas por ordem de eluição de CG.

Os componentes dos óleos essenciais foram identificados por comparação de seus espectros de massa com os espectros disponíveis na base de dados de equipamentos (NIST05

e WILEY8). Além disso, os índices de retenção medidos foram comparados com os descritos na literatura (ADAMS, 2007).

5.2.4. Linhagens e Cultivo Celular

A citotoxicidade *in vitro* foi estudado usando A549 (células de carcinoma de pulmão), cedidas pelo INMETRO. As células foram mantidas em garrafas de poliestireno, contendo meio DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium) (Life Technologies, Gibco-BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Cultilab, Campinas, SP, BRA) e 2% de antibióticos Penicilina – Estreptomicina (Sigma), em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio ótico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu a cada 48 horas ou sempre que houvesse necessidade de repor nutrientes. Quando o limite de confluência (aproximadamente 80%) de células era alcançado o ensaio de citotoxicidade era realizado e/ou as células eram repicadas e congeladas para posterior utilização.

Como se trata de células aderentes, o agente de dissociação utilizado para as subculturas e a realização dos experimentos, foi a solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) para ressuspender as células das garrafas de cultura.

5.2.5 Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico dos óleos essenciais

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), o qual é baseado na redução deste sal, de cor amarela, pela ação de desidrogenases mitocondriais em formazan, um produto púrpura e insolúvel (MOSMANN, 1983). Para a realização deste ensaio, alíquotas de 1×10^4 células A549 foram semeadas em cada poço de placas de poliestireno de 96 poços. As placas foram incubadas por 24h à 37°C, 5% de CO₂ e 80% de umidade para permitir a adesão das células ao fundo dos poços. Após este período, o meio de cultura original foi removido dos poços e substituído por um volume de 200µl dos óleos essenciais dissolvidos em meio de cultura em concentrações variando de 20 a 160 µg/mL. Em nenhuma das concentrações utilizadas a porcentagem de DMSO ultrapassou 0,1% (v/v).

Após um período de 24 horas de incubação a 37°C, 5% de CO₂ e 80% de umidade, os meios de cultura contendo os óleos e os controles, foram retirados e as células foram lavadas com PBS. Em seguida, foram adicionados 200µl de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) numa concentração de 0,5 mg/mL e as células foram incubadas por 3 horas nas mesmas condições. Após este período o sobrenadante foi desprezado e, para solubilizar o precipitado de formazan gerado, 200 µL de DMSO foram adicionados aos poços. O acúmulo de formazan foi determinado pela leitura da absorbância após 10 minutos em espectrofotômetro a 570 nm (MARINHO-FILHO et al., 2010). As absorbâncias obtidas pela leitura das placas foram utilizadas para o cálculo da viabilidade celular dos tratamentos com base na seguinte equação:

$$\%Viabilidade\ celular = \frac{Abs\ (células\ tratadas) - Abs\ (branco)}{Abs\ (controle\ positivo) - Abs\ (branco)} \times 100$$

Como controle positivo foi utilizada a Doxorrubicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) diluída em DMEM completo numa concentração final de 30 µg/ml. Como controle negativo, as células foram cultivadas em meio DMEM completo suplementado com 0,1% DMSO. Cada ensaio foi realizado em quadruplicata e repetido pelo menos 3 vezes.

Para a repetição dos ensaios as células foram repicadas e utilizadas até no máximo a 8ª passagem (P8).

5.2.6. Análise morfológica – Coloração por hematoxilina e eosina

Células A549 foram semeadas ($1,0 \times 10^5$ células em meio DMEM completo) em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares no fundo. As placas foram mantidas por um período de 24 horas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 80% de umidade para adesão e confluência das células sobre as lamínulas. Após este período, o meio de cultura original foi removido dos poços e substituído por um volume de 1 mL dos óleos essenciais dissolvidos em meio de cultura em concentrações correspondentes a 0,5x, 1,0x e 1,5x a IC₅₀ de cada genótipo. Deste modo, as células foram tratadas com 37,5; 75,0 e 102,5 µg/mL do óleo essencial de LG-106 e 80,0; 160,0 e 240 µg/mL do óleo essencial de LG-110. As concentrações dos óleos essenciais de LS-104 utilizadas foram 75,0; 150,0 e 225,0 µg/mL e as de LS-102 foram 47,0; 98,0 e 145 µg/mL. Com relação a *L. alba*, o óleo essencial do genótipo LA57 foi utilizado nas concentrações de 35,0; 70,0 e 105,0 µg/mL ao passo que 43,0; 86,0 e 129,0 µg/mL foram as concentrações utilizadas do genótipo LA-13.

Após o período de tratamento as células foram fixadas em metanol por 1 minuto e em seguida foram coradas por hematoxilina e eosina. As lamínulas foram então retiradas dos poços e montadas em lâminas de microscopia. As lâminas foram avaliadas em microscópio ótico (Olympus BX41, Tóquio, Japão) sob aumento de 400x no qual as alterações morfológicas foram avaliadas (FERREIRA et al., 2011). Foi realizada a contagem das células presentes em pelo menos 10 campos aleatórios por lâminas e as células foram classificadas como “com morfologia normal” e “com morfologia alterada”.

5.2.8 Análise Estatística

Os valores de IC₅₀ foram obtidos por regressão não linear, através do programa GRAPHPAD PRISM 5.01 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

Os valores médios das contagens de células morfológicamente alteradas foram comparados entre os grupos por meio de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando o valor de p fosse menor ou igual a 0,05 (teste de normalidade).

5.3 Resultados

5.3.1 Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Lippia spp.*

A análise por CG-EM dos óleos essenciais das três espécies de *Lippia* permitiu identificar a predominância do monoterpeno carvacrol nos genótipos de *L. gracilis* 110 (LG-110) e *L. sidoides* 104 (LS-104) e timol nos genótipos de *L. gracilis* 106 (LG-106) e *L. sidoides* 102 (LS-102). Carvona e Limoneno foram os monoterpenos majoritários nos dois genótipos de *Lippia alba* (LA-13 e LA-57) (Tabela 2).

TABELA 2. Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Lippia spp.*

Compostos	Percentual		Compostos	Percentual		Compostos	Percentual	
	LS-102	LS-104		LA13	LA 57		LG106	LG110
δ -3-Careno	0,12	0,10	(E) Cariofileno	-	0,27	Aromadendreno	0,07	-
1,8-Cineol	0,00	0,00	(E) Nerolidol	0,56	0,61	Biciclogermacreno	0,07	-
Acetato de timol	1,76	0,00	(E) ² -Ocimeno	0,56	0,45	Cis-hidrato de sabineno	0,07	-
Aromadendreno	0,00	0,00	Borneol	0,18	-	1,8 Cineole	3,93	2,5
Carvacrol	0,60	43,69	Carvona	52,21	61,66	Aromadrendeno	-	0,17
Cinamato de metila*	0,00	0,00	cis-Hidrato de Sabineno	0,51	-	Carvacrol	0,88	48,92
Espatulenol	0,00	0,00	Cubebol	0,22	0,20	Espatulenol	0,19	0,33
γ -Terpineno	6,84	16,56	Elemol	4,21	-	Limoneno	0,36	0,37
Ipsdienol	0,00	0,00	epi-Cubenol	0,17	-	Linalool	0,42	0,55
Limoneno	0,49	0,44	Geijereno	0,20	-	Metil timol	8,32	4,36
Linalol	0,00	0,00	Germacreno D	2,72	2,31	Mirceno	2,75	3,1
Metil timol	9,42	4,13	Guaiol	0,75	-	Oxido de Cariofileno	0,74	0,56
Mirceno	3,35	3,52	Limoneno	26,60	29,28	p-Cimeno	6,7	12,87
Óxido de cariofileno	0,00	0,00	Linalol	1,63	0,60	Terpinen-4-ol	0,57	0,63
p-Cimeno	34,11	17,83	Mirceno	0,57	0,57	a- terpineol	0,55	-
Terpinen-4-ol	0,66	0,91	Piperitenona	1,07	1,35	g-terpineol	0,09	-
Timol	38,68	6,05	Piperitona	0,52	0,77	Timol	59,26	3,66
α -Copaeno	0,00	0,00	Pregeijereno	0,22	-	Viridifloreno	0,15	0,28
α -Felandreno	0,00	0,20	Sabineno	2,34	-	b-Bisaboleno	-	0,34
α -Humuleno	0,00	0,00	Terpinen-4-ol	0,67	-	b-Cariofileno	8,57	4,45
α -Pineno	0,34	0,49	² -Bourboneno	0,39	0,29	a-Humuleno	0,47	0,34
α -Selineno	0,00	0,00	\pm -Eudesmol	1,53	-	a-Pineno	0,28	0,33
α -Terpineno	1,91	3,12	\pm -Pineno	0,15	-	b-Pineno	0,1	-
α -Thujeno	1,09	1,66	\pm -Terpineno	0,15	-	a-Terpineno	0,69	2,28
β -(Z)-Ocimeno	0,00	0,29	\pm -Thujeno	0,24	-	a-Thujeno	0,45	0,95
β -bisaboleno	0,00	0,23	³ -Eudesmol	0,44	-	a-trans Bergamoteno	0,07	0,36
β -Cariofileno	0,63	0,00	³ -Terpineno	0,28	-	Sabineno	0,05	-
β -Pineno	0,00	0,00				g-Terpineno	3,66	11,81
						Biciclogermacreno	0,07	0,26
						a-Felandreno	-	0,05

5.3.2 Avaliação da atividade citotóxica dos óleos essenciais de *Lippia* spp. em células A549

5.3.2.1 Avaliação da proliferação de células A549 - Método de MTT

A Figura 1 apresenta os gráficos de viabilidade das células de carcinoma de pulmão A549 obtidos após 24 horas de exposição aos óleos essenciais de diferentes genótipos de *L. gracilis*, *L. sidoides* e *L. alba*. Os resultados mostraram que os óleos produzidos pelas três espécies do gênero *Lippia* foram capazes de reduzir a viabilidade das mesmas de modo dose dependentes. Observa-se também que o efeito dos óleos essenciais de LG-106 e LS-102 foi mais acentuado que o de LG-110 e LS-104.

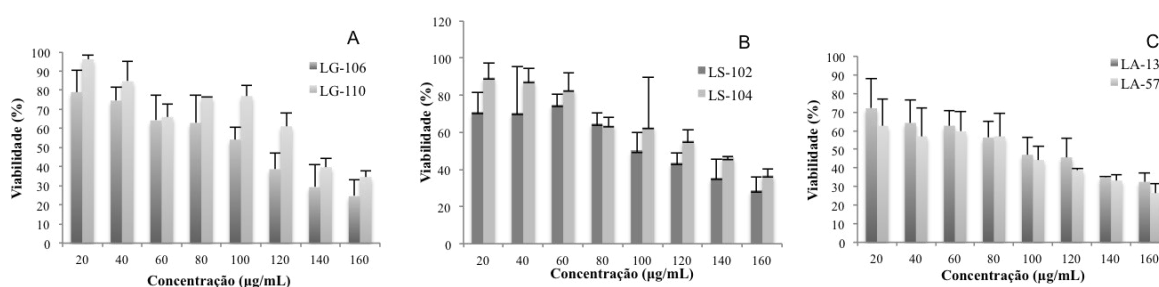


FIGURA 1. Viabilidade das células de carcinoma de pulmão (A549) expostas a concentrações crescentes do óleo essencial de diferentes genótipos de *Lippia*. As células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 µg/mL) dos óleos essenciais de *L. gracilis* genótipos LG-106 e LG-110 (A); *L. sidoides* LS-102 e LS-104 (B); *L. alba* LA-13 e LA-57 (C). A viabilidade celular foi determinada por espectrometria pelo método colorimétrico do MTT. Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em quadruplicata.

Estas diferenças de atividade observada entre os diferentes genótipos de *L. gracilis* e *L. sidoides* foram refletidas nos valores de IC₅₀, os quais são apresentados na tabela 3.

TABELA 3: Valores de IC₅₀ obtidos em células de carcinoma de pulmão (A549) tratadas com óleo essencial de *L. gracilis* genótipos LG-106 e LG-110; *Lippia sidoides* LS-102 e LS-104. e *Lippia alba* LA-13 e LA-57

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

Os valores de IC₅₀ correspondem a média (intervalo de confiança a 95%) de três experimentos independentes realizados em triplicata. Letras sobrescritas diferentes na coluna de IC₅₀ representam médias significativamente diferentes (p<0,05; teste de Kruskal-wallis e pós-teste de Dunn).

5.3.2 Alterações morfológicas induzidas pelos óleos essenciais de *Lippia* em células da linhagem A549

A capacidade dos óleos essenciais das espécies de *Lippia* em alterar a morfologia de células A549 após 24 horas de tratamento com concentrações equivalentes a 0,5x, 1,0x e 1,5x a IC₅₀ de cada genótipo foi avaliada por análise microscópica após coloração por hematoxilina-eosina. Alterações morfológicas como condensação do citoplasma, condensação da cromatina e fragmentação nuclear foram evidentes em todas as concentrações de todos os genótipos avaliados. Como esperado, o tratamento com a droga de referência, Doxorrubicina, também foi capaz de alterar a morfologia celular, porém, neste tratamento as alterações observadas foram características de lise da membrana plasmática. Na figura 3 estão representadas as principais alterações observadas no tratamento com as concentrações correspondentes a IC₅₀ de cada um dos genótipos de *Lippia* avaliados.

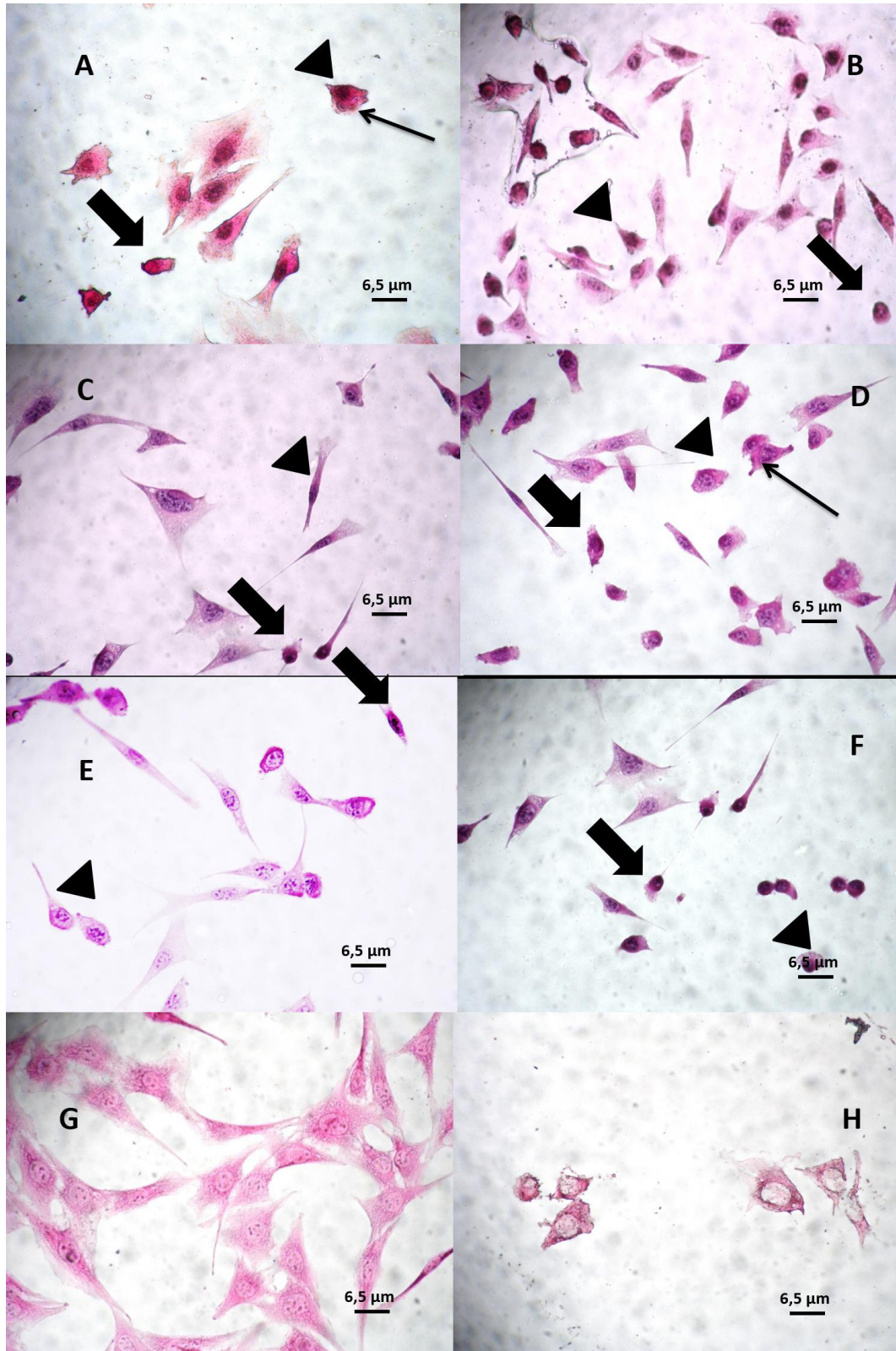


FIGURA 3: Aspectos morfológicos de células A549 após tratamento com óleos essenciais dos diferentes genótipos de *Lippia*. Células A549 foram tratadas por 24 horas com concentrações equivalentes à IC50 dos óleos essenciais de *Lippia gracilis* genótipos LG-106 e LG-110 (A e B respectivamente); *Lippia sidoides* genótipos LS-102 e LS-104 (C e D, respectivamente) e *Lippia alba* genótipos LA-13 e LA-57 (E e F respectivamente). Como controle negativo (G) as células foram tratadas apenas com o DMEM suplementado com DMSO (0,1% v/v). Doxorubicina a 30 µg/mL (H) foi usada como droga de referência (controle positivo). Os símbolos apontam as principais alterações morfológicas encontradas: (▲) condensação do citoplasma; (■) formação de corpos apoptóticos; (●) condensação da cromatina e fragmentação nuclear.

As alterações morfológicas também foram quantificadas e a porcentagem de células que apresentaram alterações foi calculada. A presença de alterações morfológicas foi observada em cerca de 30% das células A549 não tratadas. Porém, como apresentado na Tabela 4, foi observado o aumento do número de células com alterações morfológicas em todas as condições de tratamento com os óleos essenciais de *Lippia*, exceto na concentração de 75 µg/mL dos óleos essenciais de LS-104 e LG-110. Vale ressaltar que nos tratamentos com o óleo de LG-106, a porcentagem de células com alterações morfológicas atingiu valores acima de 90%, valores estes comparados com o observado para o tratamento com Doxorubicina.

TABELA 4: Porcentagem de células com morfologia normal e alterada quando tratadas com a IC₅₀ de cada genótipo.

Genótipos	Concentrações	Células com morfologia normal (%)	Células com morfologia alterada (%)
LG-106	0,5x IC ₅₀ (37,5 µg/mL)	16,80	83,20
	1,0x IC ₅₀ (75 µg/mL)	5,26	94,74
	1,5x IC ₅₀ (112,5 µg/mL)	4,73	95,27
LG-110	0,5x IC ₅₀ (75 µg/mL)	70,00	30,00
	1,0x IC ₅₀ (150 µg/mL)	46,59	53,41
	1,5x IC ₅₀ (225 µg/mL)	31,82	68,18
LA-13	0,5x IC ₅₀ (43 µg/mL)	39,67	60,33
	1,0x IC ₅₀ (86 µg/mL)	46,55	53,45
	1,5x IC ₅₀ (129 µg/mL)	39,43	60,57
LA-57	0,5x IC ₅₀ (35 µg/mL)	57,05	42,95
	1,0x IC ₅₀ (70 µg/mL)	49,16	50,84
	1,5x IC ₅₀ (105 µg/mL)	38,78	61,22
LS-102	0,5x IC ₅₀ (48 µg/mL)	42,86	57,14
	1,0x IC ₅₀ (97 µg/mL)	44,74	55,26
	1,5x IC ₅₀ (145 µg/mL)	36,31	63,69
LS-104	0,5x IC ₅₀ (75 µg/mL)	72,86	27,14
	1,0x IC ₅₀ (150 µg/mL)	55,80	44,20
	1,5x IC ₅₀ (225 µg/mL)	37,14	62,86
Doxorubicina	1,0x IC ₅₀ (30 µg/mL)	9,27	90,73
DMEM/DMSO	0,1% v/v	68,83	31,17

Apesar do aumento observado, a análise estatística revelou que todas as concentrações dos óleos essenciais de LG-106, LA-13 e LS-102 induziram aumento significativo na porcentagem de células morfológicamente alteradas. Porém, somente as concentrações equivalentes a 1,0x e 1,5x a IC₅₀ dos óleos essenciais de LG-110 e LA-57 induziram aumento significativo na porcentagem de alterações morfológicas. Finalmente, com relação ao óleo de LS-104, somente a concentração equivalente a 1,5x a IC₅₀ foi capaz de induzir aumento significativo nas alterações morfológicas (Figura 4).

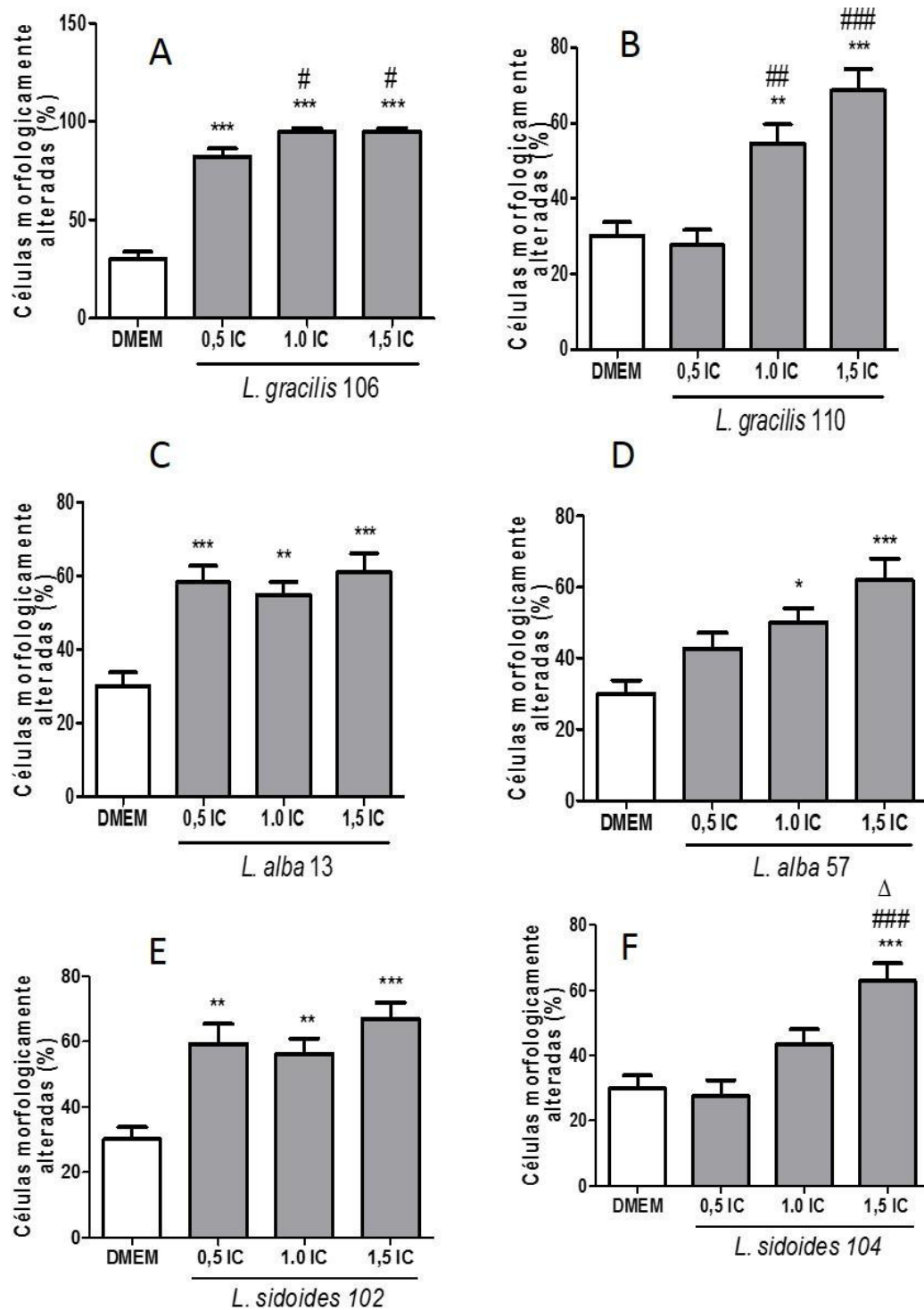


Figura 4. Avaliação quantitativa da ocorrência de células A549 morfologicamente alteradas pelo tratamento com os óleos essenciais de *Lippia* spp. As células foram tratadas durante 24 horas com concentrações correspondentes a 0,5x; 1,0x e 1,5x a IC₅₀ dos óleos essenciais de *L. gracilis*, genótipos LG-106 (A) e LG-110 (B); *L. alba*, genótipos LA-13 (C) e LA-57 (D); *L. sidoides*, genótipos LS-102 (E) e LS-104 (F). A ocorrência de alterações morfológicas foi avaliada pela análise microscópica. Foram analisadas pelo menos 150 células em 10 campos por tratamento. Os dados são apresentados como média e desvio padrão de células com morfologia alterada por tratamento. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o controle negativo e $\Delta p \leq 0,05$; # $p \leq 0,05$; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ na comparação dos tratamentos entre si por ANOVA de 1 fator seguido pelo teste de TUKEY.

5.4 Discussão

Durante o tratamento para o câncer, as células tumorais adquirem resistência às drogas, limitando desta forma o tratamento e as escolhas terapêuticas para o paciente (POMMIER, 2004). Várias pesquisas demonstram interesse nos produtos naturais principalmente naqueles que apresentam potencial citotóxico e antitumoral, disponibilizando assim, diversas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, no presente estudo investigou-se o potencial citotóxico de óleos essenciais extraídos de plantas do gênero *Lippia* em células de carcinoma de pulmão da linhagem A549.

A análise da composição química das espécies avaliadas (Tabela 2) mostra que os genótipos 110 de *L. gracilis* (LG 110) e 104 de *L. sidoides* (LS 104) apresentam mais de 40% de carvacrol em sua composição enquanto que os genótipos 106 de *L. gracilis* (LG 106) e 102 de *L. sidoides* (LS 102) têm o timol como componente majoritário. Por outro lado, ambos os genótipos de *Lippia alba* (LA 13 e LA 57) apresentam Carvona e Limoneno como componentes majoritários apesar de diferirem entre si quanto ao perfil de constituintes totais.

A avaliação do efeito destes óleos sobre a viabilidade celular demonstrou que os mesmos apresentam diferentes níveis de citotoxicidade em células de carcinoma de pulmão. Apesar de os gráficos de inibição da viabilidade apresentarem perfis semelhantes nas três espécies avaliadas (Figura 1), os valores de IC₅₀ variaram entre as espécies assim como entre os genótipos (Tabela 3). Com base nestes valores, observa-se que a ação citotóxica dos genótipos de *L. sidoides* e *L. gracilis* seguiram um padrão semelhante, tendo sido observada uma diferença de 1,5 e 2,0 vezes no potencial citotóxico entre os genótipos destas duas espécies, respectivamente.

Analisando os genótipos individualmente, observa-se uma relação entre a composição química dos óleos e o potencial citotóxico dos mesmos. LG-106 e LS-102 ricos em timol, apresentaram valores mais baixos de IC₅₀ (75,42 e 97,93 µg/mL, respectivamente) quando comparados com os valores obtidos para LG-110 e LS-104 (ricos em carvacrol) os quais foram, respectivamente, 158,6 e 150,70 µg/mL.

Relação semelhante foi anteriormente observada no estudo realizado por Melo et al (2014), no qual foi avaliado o efeito citotóxico do óleo essencial de diferentes genótipos de *L. gracilis* frente a três diferentes linhagens de células tumorais. Os valores de LC₅₀ obtidos para o genótipo rico em timol (LGA-106) foram de 2 a 4 vezes inferiores àqueles revelados para os genótipos ricos em carvacrol (LG-109 e LG-201). Do mesmo modo, quando os monoterpenos foram avaliados isoladamente, o timol apresentou maior efeito citotóxico sobre as linhagens tumorais quando comparado ao do carvacrol. Apesar de timol e carvacrol serem isômeros, eles exibem diferentes níveis de citotoxicidade também em células não tumorais, sendo o carvacrol quatro vezes menos tóxico para estas células (MELO et al., 2014). Com isso, pode-se sugerir que o efeito citotóxico mais evidente de LG-106 e LS-102 pode ser devido aos elevados teores de timol presentes em seus respectivos óleos essenciais. Porém, pelo fato de os óleos essenciais serem misturas complexas, suas propriedades biológicas não podem ser atribuídas a um composto isoladamente, tendo em vista uma possível interação entre seus componentes (BAKKALI et al., 2008). Além disso, a resposta à ação destes compostos pode variar em diferentes tipos celulares. Ferraz et al. (2013), demonstraram que o óleo essencial de *Lippia gracilis* rico em timol apresentou potencial efeito citotóxico contra diferentes linhagens de células tumorais, incluindo hepatocarcinoma (HepG2) assim como contra células não tumorais (linfócitos normais - PBMC). Todavia, ao contrário do observado por Melo et al (2014), o timol assim como outros componentes do referido óleo, quando foram testados na forma isolada não apresentaram citotoxicidade em nenhum destes dois tipos de células.

Em se tratando da espécie *L. alba* os genótipos LA-13 e LA-57 apresentaram efeitos citotóxicos semelhantes frente às células A549. Tal semelhança pode ser devida a similaridade na constituição química dos dois genótipos avaliados, que apresentam concentrações de carvona superiores a 50% e de limoneno acima de 25 % em suas

composições. A ação antiproliferativa do óleo essencial de *L. alba* frente a linhagem A549 foi observada anteriormente em estudo realizado por Gomide e colaboradores (2013). O óleo avaliado apresentava composição química semelhante a dos genótipos aqui estudados e o valor de IC₅₀ obtido no referido estudo foi de 47,80 µg/ml. Mesa-Arango et al. (2009), já haviam demonstrado o efeito antiproliferativo do óleo essencial de *L. alba* colombiana frente a células HeLa. Neste caso, a CC₅₀ obtida foi de 74,5 µg/mL e os componentes mais abundantes no óleo eram também carvona e limoneno. Desta maneira, podemos atribuir o potencial citotóxico dos óleos essenciais de LA-13 e LA-57 à presença de altos níveis de carvona e limoneno em suas composições. Alguns estudos demonstraram a atividade citotóxica da carvona em células tumorais. Patel e Thakkar (2014) demonstraram o efeito antiproliferativo e apoptótico da L-carvona em linhagens MCF7 e MDA MB21 de câncer de mama. Anteriormente, a capacidade da carvona em prevenir o desenvolvimento de câncer de pulmão induzido quimicamente em camundongos já havia sido demonstrada (WATTENBERG et al., 1989). Raphael e Kuttan (2003) verificaram que a administração de 100 mg/kg de peso corporal limoneno foi capaz de reduzir em 65% a progressão metastática de células de melanoma B16F-10 em camundongos. Mais recentemente, foi demonstrado por Andrade et al (2015) que o análogo químico (+)-limoneno 1,2-epóxido apresenta atividade citotóxica variando de intermediária a alta em células tumorais humanas HCT-116 (cólon), OVCAR-8 (ovário) e SF-295 (cérebro).

O efeito dos óleos essenciais das três espécies de *Lippia* sobre as células A549 também foi analisado a partir de aspectos morfológicos por meio de microscopia. Após 24 horas de tratamento foi observada diminuição da densidade celular e um aumento do número de células arredondadas e destacadas. Além disso, alterações estruturais como fragmentação nuclear, condensação do citoplasma e do núcleo e protusões da membrana (“*blebbings*”) foram significativamente mais frequentes nas células tratadas com os óleos essenciais de todos os quimiotipos em comparação às células controle. Alterações morfológicas desta natureza são características típicas de células apoptóticas e parecem ser um mecanismo comum associado a ação dos óleos essenciais de *Lippia*. Um estudo realizado por Ferraz et al (2013) mostrou que após 24 horas de exposição a 5,0 µg/mL do óleo essencial de *L. gracilis*, células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 apresentaram alterações em sua morfologia, incluindo redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Análises complementares envolvendo coloração com laranja de acridina e ativação de caspases confirmaram que o óleo essencial de *L. gracilis* rico em timol induziu o processo de apoptose caspase-dependente em células HepG2 (FERRAZ et al., 2013). Esta situação ainda deve ser testada na linhagem de células de carcinoma de pulmão A549 avaliadas no presente estudo.

Assim como o óleo essencial de *Lippia*, o efeito citotóxico de seus componentes majoritários também está associado a estes tipos de alterações morfológicas. Conforme demonstrado por Koparal e Zeytinoglu (2003), células A549 quando tratadas com carvacrol (componente majoritário de LG-110 e LS-104) exibiram encolhimento do citoplasma e perda de contatos célula-célula, além de condensação e fragmentação da cromatina. Do mesmo modo, fragmentação dos núcleos e presença de corpos apoptóticos foram observadas em células de carcinoma de mama tratadas com L-carvona, componente majoritário dos óleos essenciais de LA-13 e LA-57 (PATEL e THAKKAR, 2014).

Assim, os dados apresentados neste trabalho evidenciam a capacidade antiproliferativa e citotóxica dos óleos essenciais de *L. gracilis*, *L. sidoides* e *L. alba* frente à células de carcinoma de pulmão da linhagem A549. Além disso, diferenças no potencial citotóxico do óleo essencial dos diferentes genótipos estudados podem ser associadas às diferenças na composição química dos mesmos. Finalmente, as alterações morfológicas detectadas sugerem que a ação citotóxica dos óleos deve-se a capacidade dos mesmos em desencadear processos de morte celular por apoptose.

5.5 Referências Bibliográficas

ADAMS R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Allured Publishing Corporation, Carol Stream** 4th ed. 2007.

ANDRADE, L. N.; AMARAL, R. G.; DÓRIA, G. A. A.; FONSECA, C. S.; DA SILVA, T. K. M., ALBUQUERQUE Júnior, R. L. C., e de SOUSA, D. P. In Vivo Anti-Tumor Activity and Toxicological Evaluations of Perillaldehyde 8, 9-Epoxyde, a Derivative of Perillyl Alcohol. **International journal of molecular sciences**, 17(1), 32.2016.

AUPÉRIN, A.; LE PÉCHOUX, C.; ROLLAND, E.; CURRAN, W. J.; FURUSE, K.; FOURNEL, P., YAMANAKA, T. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 13, p. 2181-2190, 2010.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology** v. 46.2. 446-475, 2008.

CARVALHO, B. M. C. **In vitro screening of the anticancer activity of marine and soil-derived fungi extracts and compounds used alone and combined with doxorubicin: evaluation of the anticancer properties of fungi extracts and compounds alone and in combination with doxorubicin in lung cancer cells**. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências do Mar) – Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, 2014.

CHEN, W.; ARMSTRONG, B. K.; ZHENG, R.; ZHANG, S.; YU, X.; CLEMENTS, M. Cancer burden in China: a Bayesian approach. **BMC Cancer**, v. 13, p. 458, 2013.

FERRAZ, R. P., BOMFIM, D. S., CARVALHO, N. C., SOARES, M. B., da Silva, T. B., MACHADO, W. J.; Bezerra, D. P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, 20(7), 615-621, 2013.

FERREIRA, P. M. P.; FARIAS, D. F.; VIANA, M. P.; SOUZA, T. M.; VASCONCELOS, I. M.; SOARES, B. M.; CARVALHO, A. F. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 3, p. 1045-1058, 2011.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GOMIDE, M. D. S.; LEMOS, F. D. O.; LOPES, M. T.; ALVES, T. M. D. A.; VICCINI, L. F.; COELHO, C. M. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 23.6, 895-902, 2013.

GOMPEL, A. et al. Oncology in medilife and beyond. **Climateric**, v. 16, p. 522–535, 2013.

HUSSAIN, S.A; SULLIVAN, R. Cancer control in Bangladesh. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. v. 43/12, 1159– 1169, 2013.

- INCA. Instituto Nacional do Câncer. Incidência do Câncer no Brasil 2012. **Ministério da Saúde**, 2012.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. Incidência do Câncer no Brasil 2013. **Ministério da Saúde**, 2013.
- KOPARAL, A. T. e MELIH Z. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549. **Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects. Springer Netherlands**, 2003. 207-211.
- LCNSCO. Lung cancer non-small cell overview. American Cancer Society, 2011. Disponível em: <<http://www.cancer.org>>. Acesso em: 06 jan. 2016.
- MARINHO FILHO, J. D. B.; MORAES, M. O. de. Novel 2-(R-phenyl)amino-3-(2-methylpropenyl)-[1,4]-naphthoquinones: synthesis, characterization, electrochemical behavior and antitumor activity. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 21, n. 1, p. 169-178, 2010.
- MELO, J. O., FACHIN, A. L., RIZO, W. F., JESUS, H. C. R., ARRIGONI-BLANK, M. F., ALVES, P. B., ... & Blank, A. F.. Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts. **Genetics and Molecular Research**, 13(2), 2014. 2691-2697.
- MESA-ARANGO, A. C., MONTIEL-RAMOS, J., ZAPATA, B., DURÁN, C., BETANCUR-GALVIS, L., & STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104(6), 878-884 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65: 55-63, 1983.
- PATEL PB, THAKKAR VR. L-carvone induces p53, caspase 3 mediated apoptosis and inhibits the migration of breast cancer cell lines. **Nutr Cancer**, v. 66, n. 3, p. 453-462, 2014.
- POMMIER Y, SORDET O, ANTONY S, HAYWARD RL, KOHN KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. **Oncogene**; 23: 2934-2949, 2004.
- RAPHAEL TJ, KUTTAN G. Effect of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene and perillic acid in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F-10 melanoma cells. **J Exp Clin Cancer Res**. 22(3):419-24. 2003
- SANTOS, M. S. C. **Citotoxicidade Induzida Por Nanoemulsoes De Selol Em Células De Adenocarcinoma De Pulmao Humano**. Brasília: Universidade de Brasília, 79 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2013.
- SOARES, B.V.; DIAS, M.T. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)** v. 3, n. 1, p. 109-123, Macapá, 2013.

TARVER, Talicia. Cancer Facts & Figures 2012. American Cancer Society (ACS) Atlanta, GA: American Cancer Society, 2012. 66 p., pdf. Available from. **Journal of Consumer Health on the Internet**, v. 16, n. 3, p. 366-367, 2012.

WATTENBERG, L. W.; SPARNINS, V. L.; BARANY, G. Sparnins, and George Barany. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. **Cancer research**, v. 49, n. 10, p. 2689-2692, 1989

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.