

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

JACQUELINE GONÇALVES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Thymus vulgaris L. (TOMILHO) E DO TIMOL EM FIBROBLASTOS E CÉLULAS
TUMORAIS DE PULMÃO**

PONTA GROSSA

2020

JACQUELINE GONÇALVES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Thymus vulgaris L. (TOMILHO) E DO TIMOL EM FIBROBLASTOS E CÉLULAS
TUMORAIS DE PULMÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, área de concentração em Fisiologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Cristine Kanunfre.

PONTA GROSSA

2020

S237 Santos, Jacqueline Gonçalves dos
Avaliação da toxicidade da fase vapor do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e do timol em fibroblastos e células tumorais de pulmão / Jacqueline Gonçalves dos Santos. Ponta Grossa, 2020.
62 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre.

1. Câncer de pulmão. 2. Linhagem A549. 3. Linhagem H292. 4. Linhagem MRC-5. 5. Irradiação. I. Kanunfre, Carla Cristine. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fisiologia e Fisiopatologia. III.T.

CDD: 616.2



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 05/2020, DA MESTRANDA Jacqueline Gonçalves dos Santos REALIZADO NO DIA 16 DE Abril DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dezois dias de Abril de dois mil e vinte, às 14hs00min, em conformidade com o Art.2º da portaria CAPES n. 36 de 19 de março de 2020, através do sistema de webconferencia do NUTEAD da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em seção pública, sob a presidência da Professora Dr^a Carla Cristine Kanunfre reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Jacqueline Gonçalves dos Santos** na linha de pesquisa: Pesquisa de compostos com atividades biológicas, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Professora Dr^a Michele Dietrich Moura Costa (UEPG/PR) e Professora Dr^a Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. (TOMILHO) E DO TIMOL EM FIBROBLASTOS E CÉLULAS TUMORAIS DE PULMÃO”**. Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como **APROVADA**. Considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, a aluna deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____
Alteração de título: não

Prof^a Dr^a Carla Cristine Kanunfre - (DEBIO - UEPG) – Presidente

Prof^a Dr^a Michele Dietrich Moura Costa (UEPG/PR) (DEBIOGEM - UEPG) – Titular

Prof^a Dr^a Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri - (UFPR/PR) – Titular

Ponta Grossa, 16 de Abril de 2020.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
Olga e José, que são os meus maiores
incentivadores.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dr^a. Carla Cristine Kanunfre, pela confiança e por todo o trabalho de orientação feito com dedicação, o que proporcionou condições que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada pelas oportunidades e por todos os ensinamentos, científicos e também não-científicos, que levarei para a vida. Você é uma mulher, orientadora e cientista maravilhosa.

Aos meus familiares, especialmente pai, mãe e irmã, que sempre me incentivam, torcem por mim e enxergam importância no que eu faço. Também agradeço aos meus queridos avós que, com toda a sua doçura e amor, me incentivam.

Ao meu namorado Weverton por estar sempre disposto a me ouvir e me aconselhar, seja quando estou empolgada com ideias novas ou experimentos que deram certo, seja quando estou insegura ou chateada por algo que deu errado. Obrigada pelo companheirismo e por me incentivar.

À toda a equipe do laboratório M-59, Marilene, Maria Domênica, Luiza, Mariele, Felipe, Loanda e Rosana por todas as conversas e auxílios nos trabalhos do laboratório. Agradecimento especial ao técnico Marcelo Paulo Bueno por ter feito mais que seu trabalho, auxiliando em tarefas do laboratório e ainda por ter ensinado passos da técnica de cultivo celular.

Às amigas que fiz durante esses dois anos com a Maria Domênica Nadal, Marilene Biavatti e Luiza Stolz Cruz. Obrigada por todas as conversas, ajudas, conselhos, risos, brincadeiras e muito mais. Vocês são mulheres, amigas e cientistas maravilhosas.

Aos colegas de turma, especialmente à Ana Caroline por sempre estar compartilhando comigo experiências vividas no laboratório, dúvidas, artigos, protocolos e palavras de conforto e incentivo.

Ao Complexo Sul-Paranaense de Oncologia (ISPON) por aprovar nosso projeto e permitir o uso da máquina de radiação. Obrigada ao Dr. Gianluca Mansani pela parceria nesta etapa e por estar sempre disposto a nos receber para discutir sobre o projeto. Agradecimentos especiais aos técnicos do Complexo ISPON que

dedicaram alguns minutos extras dos seus horários de trabalho para nos auxiliar com a irradiação das células, muito obrigada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas por todos os ensinamentos, em especial ao professor Dr. Edmar Miyoshi por dedicar um período fora das aulas para dar dicas sobre apresentações de slides.

À professora Dr^a. Dionízia Xavier Scomparim por ter me concedido a oportunidade de realizar estágio docente em sua disciplina.

À professora Dr^a. Maria Albertina de Miranda Soares por estar sempre disposta a auxiliar com a microscopia de fluorescência.

À equipe do Laboratório M-13 por permitirem o uso da leitora de placas.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela infraestrutura e recursos financeiros e à CAPES pela concessão da bolsa.

A todas as pessoas não mencionadas aqui, mas que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

SANTOS, Jacqueline Gonçalves dos. **Avaliação da toxicidade da fase vapor do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e do timol em fibroblastos e células tumorais de pulmão.** 2020. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2020.

Os óleos essenciais (OE) são fontes de compostos com atividades farmacológicas diversas. Devido a sua volatilidade, os componentes podem ser entregues diretamente ao tecido pulmonar por inalação, característica interessante para o tratamento do câncer de pulmão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade da fase vapor do OE de tomilho e de seu composto majoritário, o timol, sobre as linhagens tumorais de pulmão A549 e H292, bem como sobre a linhagem MRC-5, modelo de fibroblastos de pulmão não tumoral. Para tanto, o OE de tomilho foi adquirido comercialmente e a análise química via CG/EM confirmou como composto majoritário o timol (41,84%). Para os testes *in vitro*, 1×10^4 células/mL foram semeadas nos 8 poços centrais de placas de cultivo de 24 poços e tratadas por 24, 48 e 72 h com o vapor de diferentes concentrações do OE (62,5-1000 µg/mL/poço) e do timol (31,25-500 µg/mL/poço), que foram adicionados aos poços livres de células, adjacentes aos 8 centrais. A citotoxicidade foi avaliada por meio dos ensaios de redução de MTT e coloração com Sulforodamina B e expressa em concentração capaz de gerar vapor que causa redução da viabilidade celular em 50% (CIV₅₀). Ambos, o OE e o timol, foram citotóxicos para as três linhagens de maneira dose dependente, entretanto, o timol apresentou maior toxicidade. Nos tratamentos de 48 h foram obtidos os valores da CIV₅₀ para a linhagem A549 de 305 µg/mL/poço e 150 µg/mL/poço quando empregado o OE e timol, respectivamente. Para a linhagem H292 os valores foram de 648 e 137,9 µg/mL/poço. A fase vapor do timol apresentou-se menos tóxica para a linhagem não tumoral (MRC-5), com índice de seletividade superior a 2 quando considerado o período de 48 h de tratamento. Para avaliar a existência do efeito citotóxico sinérgico do timol com a radiação, as células foram tratadas pelo período de 6h com o composto (31,25-125 µg/mL/poço) antes da exposição a 9 Gray de radiação. Após 48 h foram realizados os ensaios para avaliação da viabilidade celular. Verificou-se que o timol atuou em sinergia com a radiação, causando maior redução da viabilidade das células tumorais. Os resultados obtidos indicam que a citotoxicidade da fase vapor do OE de tomilho é devido, principalmente ao seu composto majoritário, timol, que foi mais citotóxico e seletivo que o OE, mostrando-se como potencial radiosensibilizante quando empregado em associação à radiação.

Palavras-chave: Câncer de pulmão. Linhagem A549. Linhagem H292. Linhagem MRC-5. Irradiação.

ABSTRACT

SANTOS, Jacqueline Gonçalves. **Evaluation of the vapor phase toxicity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. (thyme) and thymol in fibroblasts and lung tumor cells.** 2020. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2020.

Essential oils (EO) are a source of compounds with diverse pharmacological activities. Due to their volatility, the components can be directly delivered to the lung tissue by inhalation, an interesting characteristic for the treatment of lung cancer. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of the vapor phase of the thyme EO and its major compound, thymol, on the lung cancer cells A549 and H292, as well on the MRC-5 line, a non-tumor lung fibroblast model. For this purpose, the thyme EO was acquired commercially and chemical analysis via CG/MS confirmed thymol as the major compound (41.84%). To perform *in vitro* tests, 1×10^4 cells/mL were seeded in the 8 central wells of 24-well culture plates and treated for 24, 48, and 72 h with vapor phase of different concentrations of OE (62.5-1000 $\mu\text{g/mL/well}$) and thymol (31.25-500 $\mu\text{g/mL/well}$), which were added to the cell-free wells. Cytotoxicity was assessed by MTT reduction and Sulforodamine B staining assays and expressed as concentration capable of generating vapor that causes 50% reduction of cell viability (ICV₅₀). Both OE and thymol were cytotoxic to the three cell lines in a dose dependent manner, however thymol showed greater toxicity. In the 48 h treatments were obtained the ICV₅₀ to A549 cell line of 305 $\mu\text{g/mL/well}$ and 150 $\mu\text{g/mL/well}$ when using OE and thymol, respectively. To H292 cells it was 137.9 and 648 $\mu\text{g/mL/well}$. The vapor phase of the thymol was less toxic for the non-tumor cells (MRC-5), with the selectivity index (SI) greater than 2 considering the period of 48 h of treatment. To evaluate the synergic cytotoxic effect of thymol with radiation, cells were treated for 6 hours with the compound (31.25-125 $\mu\text{g/mL/well}$) before exposure to 9 Gray (Gy) of radiation. After 48 hours, cell viability assays were performed. The vapor phase of thymol acted in synergy with the radiation, causing a greater reduction in the viability of tumor cells. The results indicate that the cytotoxicity of the vapor phase of the thyme OE is due mainly to its major compound, thymol, which was more cytotoxic and selective than the OE, being a potential radiosensitizer when used in association with radiation.

Keywords: Lung cancer. A549 cell line. H292 cell line. MRC-5 cell line. Irradiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número estimado de casos incidentes de câncer e mortes em todo o mundo, ambos os sexos e todas as idades em 2018.....	16
Figura 2 - Número de casos incidentes de câncer no Brasil, ambos os sexos, todas as idades em 2018.....	17
Figura 3 - Alvos de ação dos óleos essenciais.....	23
Figura 4 - Ilustração da estratégia de semeadura utilizada para avaliar o efeito da fase vapor do OE de tomilho e de seu composto majoritário, timol.	30
Figura 5 - Estrutura química do timol e p-cimeno.....	34
Figura 6 - Cromatografia gasosa do óleo essencial de tomilho.....	37
Figura 7 - Efeito da fase vapor do OE de tomilho em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem A549.	38
Figura 8 - Efeito da fase vapor do OE de tomilho em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem H292.....	40
Figura 9 - Efeito da fase vapor do timol em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem A549.	42
Figura 10 - Efeito da fase vapor do timol em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem H292.....	43
Figura 11 - Efeito da fase vapor do OE de tomilho em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem MRC-5.	45
Figura 12 - Efeito da fase vapor do timol em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem MRC-5.....	47
Figura 13 - Efeito da fase vapor do timol sobre a viabilidade celular das linhagens MRC-5, A549 e H292.	49

Figura 14 - Efeito de diferentes doses de radiação sobre a viabilidade celular das linhagens MRC-5, A549 e H292.....	50
Figura 15 - Efeito da fase vapor do timol sobre a viabilidade celular nas linhagens MRC-5, A549 e H292 irradiadas com 9 Gy.	51
Figura 16 - Comparação entre o efeito da fase vapor do timol, da irradiação e da associação dos dois sobre a viabilidade das células MRC-5 e A549.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de tomilho.....	35
Tabela 2 - Valores de CIV ₅₀ para as linhagens A549 e H292 após tratamento com fase vapor do OE de tomilho.....	39
Tabela 3 - Valores de CIV ₅₀ para a linhagens celulares A549 e H292 após tratamento com fase vapor do timol.	43
Tabela 4 - Valores de CIV ₅₀ para a linhagem MRC-5 após tratamento com fase vapor do OE de tomilho.....	46
Tabela 5 – Comparação entre os valores de CIV ₅₀ da linhagem MRC-5 e linhagens tumorais (A549 e H292) obtidos dos experimentos com fase vapor do timol.....	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
1.1 Objetivo geral.....	15
2.1 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Câncer	16
3.1.1 Câncer de pulmão: epidemiologia, classificação e tratamento	18
3.2 Óleos essenciais	21
3.2.2 Óleo essencial de tomilho como potencial antitumoral	23
3.2.3 Óleos essenciais e compostos isolados associados à radiação.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Óleo essencial de tomilho	28
4.2 Linhagens celulares e condições de cultivo	29
4.3 Determinação da citotoxicidade da fase vapor do OE de tomilho e timol....	30
4.3.2 Ensaio de redução de MTT	31
4.3.3 Ensaio de coloração de proteínas	31
4.3.4 Determinação dos valores de CIV ₅₀ e índice de seletividade da fase vapor do OE de tomilho e do timol	32

4.4 Avaliação do efeito da fase vapor do timol em células submetidas a radiação	32
4.5 Análises estatísticas	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Análise do óleo essencial de tomilho via CG/EM	34
5.2 Determinação da citotoxicidade da fase vapor do OE de tomilho e do composto majoritário timol	38
5.2.2 Determinação da seletividade da fase vapor do OE de tomilho e do timol.....	44
5.3 Avaliação do efeito da fase vapor do timol em células submetidas à radiação	48
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer, estima-se cerca de 31.200 novos casos de câncer de pulmão para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2019). Estatística preocupante porque dentre os diferentes tipos de câncer, o de pulmão é um dos tumores malignos com maior incidência e que apresenta maior taxa de mortalidade, pois no momento do diagnóstico cerca de 70% dos pacientes já apresentam invasão local ou metástases.

Como, na maior parte dos casos de câncer de pulmão, não é possível realizar a ressecção cirúrgica o tratamento preconizado é por meio da quimioterapia e radioterapia, que são bastante agressivos e causam vários efeitos adversos (FERLAY *et al.*, 2015; GLOBOCAN, 2018). Por conseguinte, se faz importante a busca por novas estratégias terapêuticas e tratamentos complementares, os quais apresentem menor toxicidade para as células não tumorais e, portanto, reduzam os efeitos adversos, melhorando a qualidade de vida e taxa de sobrevida dos pacientes.

As plantas medicinais constituem fonte abundante e diversificada de compostos com atividades farmacológicas, incluindo a ação antitumoral (GREENWELL; RAHMAN, 2015). O Paclitaxel, por exemplo, utilizado como quimioterápico no tratamento de vários tipos de cânceres, é derivado de folhas de plantas do gênero *Taxus* (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Nessa perspectiva, os óleos essenciais (OE), têm sido estudados como potenciais antitumorais. Caracterizados como misturas complexas de compostos, os OE são formados no metabolismo secundário de plantas aromáticas, constituídos principalmente por terpenos sendo, portanto, lipofílicos e altamente voláteis (GAUTAM *et al.*, 2014).

O OE de *Thymus vulgaris* L. (tomilho), em fase líquida, já foi descrito por apresentar efeitos citotóxicos em células tumorais. De fato, o OE de tomilho, dentre dez OEs estudados por Zu *et al.* (2010) foi o que apresentou maior citotoxicidade frente a linhagens de células tumorais humanas.

O principal constituinte do OE de tomilho é o timol, um monoterpeno, que também já foi estudado quanto ao seu efeito citotóxico. Kang e colaboradores (2016)

verificaram que o timol em fase líquida reduziu a viabilidade de células de câncer gástrico.

Por serem misturas complexas de substâncias que incluem componentes orgânicos voláteis, os OEs possuem diversas propriedades farmacológicas, grande parte em função de sua volatilidade, tornando-os ideais para nebulizações e inalações (EDRIS, 2007). Portanto, desde que os compostos voláteis dos OEs podem ser entregues diretamente ao tecido pulmonar por meio de inalação, há o interesse em pesquisar o efeito citotóxico da fase vapor do OE de tomilho, e de seu composto majoritário, em células tumorais de pulmão.

2 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade da fase vapor do OE de tomilho e de seu composto majoritário, timol, sobre fibroblastos (MRC-5) e linhagens tumorais de pulmão A549 e H292.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar os principais compostos do OE de tomilho.
- Determinar a citotoxicidade da fase vapor do OE de tomilho e do timol nas linhagens tumorais A549 e H292 e não tumoral MRC-5.
- Determinar a concentração do OE de tomilho e do timol capaz de gerar vapor que reduz a viabilidade celular em 50% (CIV₅₀).
- Determinar o índice de seletividade.
- Avaliar o efeito da fase vapor do timol em associação a radiação X de alta intensidade sobre a linhagem de fibroblastos de pulmão humano e linhagens tumorais.

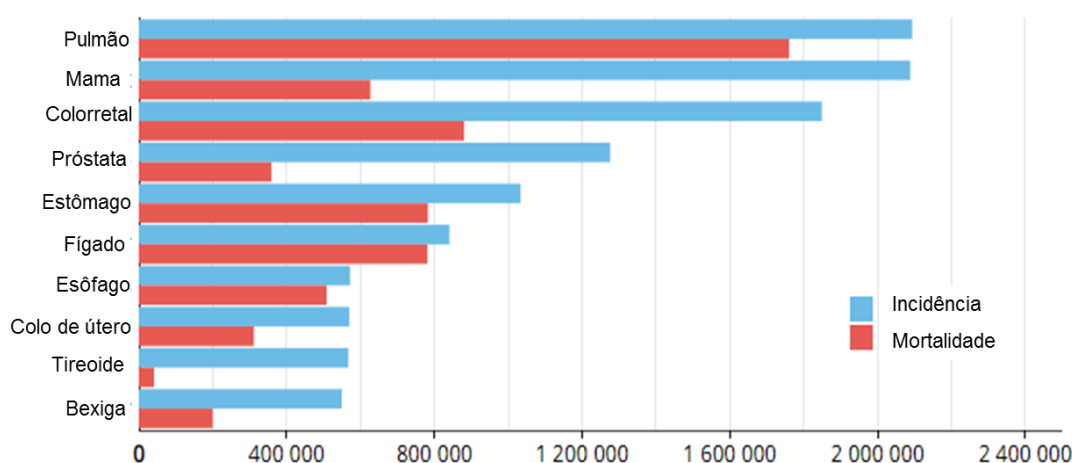
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Câncer

O câncer, ou neoplasia, representa um grande grupo de doenças, caracterizado pelo crescimento de células anormais além de seus limites habituais, que pode afetar quase qualquer parte do corpo e ainda podem se espalhar para outras regiões do corpo diferente da origem (OMS, 2018). Os últimos dados globais sobre o câncer estimaram 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes em 2018. Um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres em todo o mundo desenvolvem câncer durante a vida, e um em cada oito homens e uma em cada onze mulheres morrem por conta da doença (GLOBOCAN, 2018).

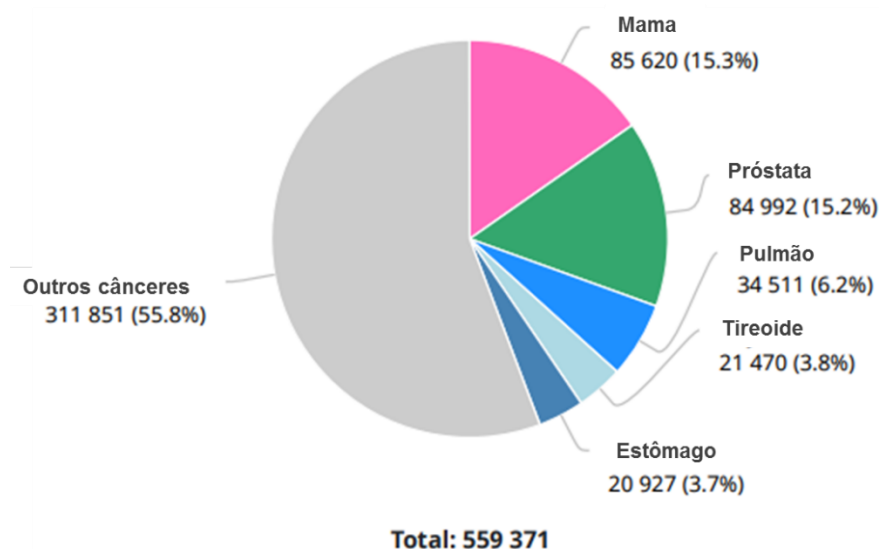
Os tumores de mama feminino, colorretal e pulmão estão entre os tipos de neoplasia com maior incidência mundial e, dentre esses três, o câncer de pulmão é o que tem a maior mortalidade (Figura 1). No Brasil, no ano de 2018, foram mais de 550 mil novos casos de câncer e mais de 240 mil o número de mortes; sendo os tumores de mama, próstata e pulmão com maior incidência (Figura 2) (GLOBOCAN, 2018).

Figura 1 - Número estimado de casos incidentes de câncer e mortes em todo o mundo, ambos os sexos e todas as idades em 2018.



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN (2019).

Figura 2 - Número de casos incidentes de câncer no Brasil, ambos os sexos, todas as idades em 2018.



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN (2019).

A neoplasia é causada por uma combinação de alterações genéticas e epigenéticas. As mutações no DNA, quando levam ao surgimento de tumores, ocorrem em quatro classes de genes: genes que regulam o crescimento celular (protoncogenes e genes supressores de tumor), genes que regulam a apoptose e genes envolvidos no reparo do DNA. Essas alterações genéticas alteram a expressão ou função de genes-chave que regulam processos celulares fundamentais (HAHN; WEINBERG, 2002).

O início e progressão do câncer também são relacionados a alterações epigenéticas, ou seja, mudanças na expressão gênica sem alterações nas sequências de DNA. As alterações epigenéticas são reversíveis e incluem processos-chave, como, por exemplo, metilação do DNA e modificação de histonas, entre outros (NEBBIOSO *et al.*, 2018). A hipermetilação do DNA pode resultar no silenciamento transcricional dos genes supressores de tumores, causando sua inativação e, subsequentemente, transformação maligna para vários tipos de câncer, enquanto a hipometilação do DNA está envolvida na ativação de protooncogenes (WAJED; LAIRD; DEMEESTER, 2001).

O acúmulo de mutações no DNA, bem como alterações epigenéticas, dá origem a uma série de propriedades que caracterizam a célula tumoral: autossuficiência nos sinais de crescimento; resistência aos mecanismos de morte celular que controlam as proliferações celulares, permitindo que as células cancerosas

sobrevivam sob condições que induzem apoptose em células normais; potencial replicativo ilimitado tornando, portanto, as células cancerosas imortais; desenvolvimento da angiogênese para sustentar o crescimento das células cancerosas; capacidade de invadir tecidos locais e disseminar-se para locais distantes (metástase); reprogramação das vias metabólicas; e capacidade de esquivar do sistema imune (HANAHA; WEINBERG, 2011).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese e geralmente acontece de forma lenta, podendo levar muito tempo para que uma célula cancerosa dê origem a um tumor. A carcinogênese, no estágio de iniciação, envolve diversos fatores que incluem exposições a agentes carcinogênicos, mutações em protooncogenes e genes supressores de tumores e desregulação de vias de sinalização necessárias para a homeostase celular (PATTERSON *et al.*, 2018).

Durante a progressão tumoral ocorre também a heterogeneidade, que provavelmente resulta de múltiplas mutações que se acumularam independentemente em diferentes gerações de células. A heterogeneidade resulta em subclones de células neoplásicas com diferentes características, como capacidade de invadir, taxa de crescimento, capacidade metastática, cariótipo, responsividade hormonal e suscetibilidade a drogas antineoplásicas (HEPPNER; MILLER, 1983; MARUSYK; ALMENDRO; POLYAK, 2012).

Os tumores podem ser classificados como benignos ou malignos; as características dos tumores malignos (coletivamente referidos como cânceres) incluem crescimento rápido, mal ou completamente indiferenciados, mal circunscritos, invadindo os tecidos normais circundantes e apresentam potencial invasivo, disseminando as células tumorais para locais distantes (metástases). Ao contrário, os tumores benignos, que não são cânceres, apresentam crescimento lento, assemelham-se ao tecido de origem, são bem diferenciados, e permanecem no local de origem (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

3.1.1 Câncer de pulmão: epidemiologia, classificação e tratamento

Dentre os diferentes tipos de câncer, o de pulmão está entre os três com maior incidência global, e é o que apresenta maior taxa de mortalidade (Figura 1) (FERLAY *et al.*, 2015; GLOBOCAN, 2018), pois no momento do diagnóstico cerca de 70% dos pacientes já apresentam invasão local ou metástases (MOLINA *et al.*, 2008; SANTINI *et al.*, 2015).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer, estimavam-se 18.740 novos casos de câncer de pulmão entre homens e de 12.530 nas mulheres para cada ano no biênio 2018-2019 (INCA, 2017). Dados divulgados pela pesquisa Globocan revelaram que houve 34.511 novos casos de câncer de pulmão no Brasil em 2018, sendo 19.169 em homens e 15.342 em mulheres e o número de mortes por conta da doença foi 31.856 (GLOBOCAN, 2019).

O risco de desenvolver câncer de pulmão é fortemente relacionado com a idade avançada associada a um histórico de tabagismo, sendo que aproximadamente 85% dos casos diagnosticados estão associados ao consumo de tabaco. Quanto maior a intensidade da exposição ao tabaco e seus derivados, o risco de desenvolvimento e de morte pela doença torna-se ainda mais elevado. A mortalidade por câncer de pulmão entre fumantes é cerca de quinze vezes maior do que entre pessoas que nunca fumaram, enquanto entre pessoas que pararam de fumar é cerca de quatro vezes maior (INCA, 2018; NCI, 2018).

Os carcinomas pulmonares surgem a partir do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que resultam na transformação do epitélio bronquial benigno em um tecido neoplásico. A exposição a agentes carcinogênicos, fumaça por exemplo, pode levar a uma série de alterações morfológicas do epitélio brônquico, progredindo da hiperplasia das células basais à metaplasia, da displasia grave ao carcinoma *in situ* e, finalmente, ao carcinoma (GRIDELLI *et al.*, 2015).

Tradicionalmente os carcinomas de pulmão são classificados em dois grandes grupos: Câncer de Pulmão de Células Pequenas (CPCP) e Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas (CPCNP). Os CPCP são bastante agressivos, geralmente apresentam metástase no momento do diagnóstico e, por isso, o tratamento é realizado com quimioterapia e não por meio de cirurgia. Já os CPCNP são menos agressivos então é possível a realização de cirurgia com terapias adjuvantes. Devido à grande variedade dentro do grupo CPCNP, a OMS apresentou subclassificações para este grupo, que incluem diversos subtipos, sendo os mais comuns o adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células (ZHENG, 2016).

O CPCNP é a causa de quase 85% de todos os cânceres de pulmão. Devido a isso, nos últimos anos houve um progresso na compreensão das características biológicas dos CPCNP, e esses estudos apoiam o desenvolvimento de novas

estratégias terapêuticas, visto que os tratamentos mais comumente usados são muito agressivos, dentre eles a quimioterapia, radioterapia e cirurgia (CHEN *et al.*, 2014).

De acordo com as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Pulmão (BRASIL, 2014), a seleção do tratamento a ser realizado para o câncer de pulmão deve ser adequada ao estadiamento clínico da doença (classificação TNM), capacidade funcional, condições clínicas e preferência do paciente. Em geral, quando o tumor ainda se encontra localizado, sem disseminação para fora do pulmão, o tratamento é cirúrgico, em alguns casos é utilizada a quimioterapia no pós-operatório (BRASIL, 2014).

No entanto, aproximadamente 70% dos pacientes apresentam invasão local ou metástase no momento do diagnóstico, nesse caso o tratamento é realizado por meio da quimioterapia ou radioterapia e/ou modalidades combinadas (MOLINA *et al.*, 2008; NOVAES *et al.*, 2008). Outra estratégia terapêutica utilizada em alguns casos avançados de cânceres, incluindo o de pulmão, é a imunoterapia. Todavia, os tratamentos são recentes, com medicamentos liberados a partir de 2015 pela FDA (*Food and Drug Administration*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e ainda possuem alto valor de custo, fator limitante para a maioria dos pacientes (GRIDELLI *et al.*, 2015; VILLANUEVA; BAZHENOVA, 2018).

Na quimioterapia utiliza-se de drogas para levar as células tumorais à morte e reduzir o tamanho do tumor. Os quimioterápicos são classificados conforme seu mecanismo de ação; a maioria reduz a proliferação das células tumorais modulando o ciclo celular, enquanto outros induzem a morte de células que não estejam em estado de proliferação, sendo descritos como fármacos ciclo-celular não específicos (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Os quimioterápicos mais utilizados no tratamento de câncer de pulmão, especialmente o CPCNP, são a cisplatina e o etoposídeo em associação. Muitos esquemas de quimioterapia sistêmica podem ser usados com finalidade paliativa, contendo medicamentos tais como cisplatina, carboplatina, etoposídeo, mitomicina C, vimblastina, docetaxel, paclitaxel, erlotinibe, gefitinibe, entre outros (BRASIL, 2014; BURDETT, 2015; MOLINA *et al.*, 2008).

A radioterapia é indicada nos casos de CPCNP em qualquer estágio tumoral, com finalidade curativa ou paliativa e em uso associado ou combinado com a cirurgia ou quimioterapia (BRASIL, 2014). Os efeitos da radiação ionizante sobre as células podem ser diretos ou indiretos; os efeitos diretos são provocados no momento da

deposição da radiação, que interage com as biomoléculas, podendo ocorrer, por exemplo, lesão no DNA. Já os efeitos indiretos ocorrem por meio de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela radiólise da água. As EROs interagem com moléculas como DNA, proteínas ou membranas lipídicas, resultando em danos celulares, disfunções e morte celular (REISZ *et al.*, 2014).

3.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos naturais complexos, produzidos como metabólitos secundários por plantas aromáticas. Eles são sintetizados, armazenados e liberados por estruturas secretoras das plantas aromáticas com a finalidade de protegê-las contra bactérias, fungos, vírus e ainda repelir insetos ou atraí-los como polinizadores (BAKKALI *et al.*, 2008).

Quanto às características físico-químicas, os OEs são líquidos, lipofílicos, apresentam forte odor, são altamente voláteis, e compostos por terpenos hidrocarbonados, que podem ser monoterpenos, sesquiterpenos ou diterpenos; terpenos oxigenados como álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres; lactonas; cumarinas; fenilpropanoides entre outros. Podem conter de 20 a 70 compostos de baixo peso molecular em concentrações bastante diferentes em um OE e, geralmente, dois ou três componentes principais apresentam-se em concentrações razoavelmente altas (20-70%) em comparação com outros componentes presentes. Os monoterpenos são os principais constituintes de muitos OEs (RUSSO *et al.*, 2015).

Todos os órgãos das plantas aromáticas são capazes de sintetizar OEs por meio de células secretoras, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Portanto, o OE pode ser extraído de diferentes partes da planta e, por isso, podem haver variações na composição química dependendo do órgão utilizado, idade e estágio vegetativo da planta, época da colheita e composição do solo. Além disso, o método utilizado para a extração do OE pode influenciar na sua composição. Mesmo que vários métodos possam ser utilizados para sua extração, a hidrodestilação é o método mais utilizado para a obtenção dos EOs (BAYALA *et al.*, 2014; RUSSO *et al.*, 2015).

Uma vez que podem haver estas variações na composição dos OEs, é importante fazer uma análise química, via cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM) a fim de identificar e quantificar os constituintes do OE, devido às suas complexidades químicas (RUSSO *et al.*, 2015). Há diversas variáveis que influenciam nas propriedades biológicas dos OEs, como a espécie da planta da qual foi extraído, a sua composição química, o organismo ou a linhagem celular no qual o OE foi testado, e todos esses fatores contribuem para seus efeitos biológicos, já que cada constituinte participa do resultado geral e pode modular os efeitos dos demais. Dentre os efeitos biológicos e farmacológicos dos OEs podem ser citadas as propriedades inseticidas, antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, analgésicas, antinociceptivas e antitumorais (AZIZ *et al.*, 2018).

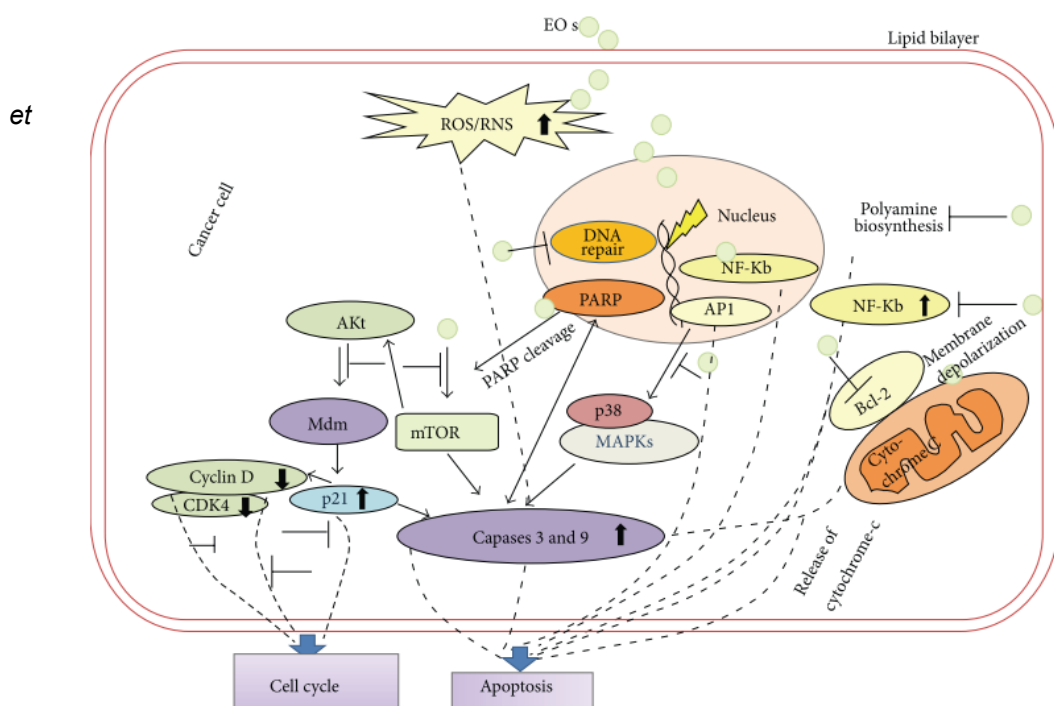
Vários estudos, conforme revisado por Andrade *et al.* (2018), demonstraram a atividade antitumoral de OEs de diversas espécies de plantas aromáticas. A maioria destes estudos defende que os OEs podem ser usados em adição à terapia anticâncer convencional ou como um tratamento complementar. Os OEs de *Afrotyrax lepidophyllus* (cebola do mato) e *Scorodophloeus zenkeri* (alho tropical), por exemplo, mostraram um forte efeito inibitório na proliferação de linhagens celulares de melanoma (A375), adenocarcinoma de mama (MDA-MB 231) e carcinoma de cólon (HCT116) (FOGANG *et al.*, 2014). Já para o câncer de intestino o OE de *Myrica rubra* (amora chinesa) apresentou efeito citotóxico em várias linhagens celulares de câncer intestinal (HCT8, SW620, SW480, HT29 e Caco2) (LANGHASOVA *et al.*, 2014).

Em geral a atividade biológica de um OE está relacionada aos principais grupos funcionais de compostos e, também, aos constituintes presentes em menor quantidade, pois há várias moléculas que podem atuar em sinergismo (BAYALA *et al.*, 2014). Koparal e Zeytinoglu (2003) pesquisaram o efeito do principal componente da maioria dos OEs, o carvacrol, em células de uma linhagem de câncer de pulmão humano (A549) e os seus resultados mostraram a diminuição da viabilidade e proliferação celular, assim como a indução de apoptose de maneira dose dependente.

A citotoxicidade dos OEs está relacionada a diversos mecanismos que envolvem apoptose, parada do ciclo celular, atividade antiproliferativa e antiangiogênica, elevação nos níveis de EROs e modulação dos mecanismos de reparo do DNA. Em um artigo de revisão, Gautam *et al.* (2014) abordam vários mecanismos de ação de diferentes OEs relatados na literatura.

Na Figura 3 estão demonstrados alguns alvos de ação do OEs, que, por serem permeáveis à membrana celular, atuam em diferentes alvos. Os OEs aumentam os níveis intracelulares de EROs, o que resulta na ativação das caspases e consequentemente na apoptose celular. Também já foi relatado que ocorre diminuição na expressão de mTOR e diminuição da fosforilação da Akt, o que resulta na superexpressão de p21, que por sua vez induz apoptose pelo aumento do nível de caspases ou resulta na parada do ciclo celular por ligação às ciclinas. Além disso, o estresse mitocondrial induzido por OEs leva à diminuição nos níveis da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e à despolarização da membrana, resultando em liberação do citocromo-c, o que leva à morte celular (SEAL *et al.*, 2012). Os OEs também agem como inibidores da DNA polimerase e levam à clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), o que também resulta em ativação de caspases e apoptose (GAUTAM *et al.*, 2014).

Figura 3 - Alvos de ação dos óleos essenciais.



Fonte:
GAUTAM
et al. (2014).

3.2.2 Óleo essencial de tomilho como potencial antitumoral

A espécie *Thymus vulgaris* L. (tomilho), que pertence à família Lamiaceae, já é usada há muito tempo na medicina tradicional por apresentar um forte potencial terapêutico (NIKOLIC *et al.*, 2014). Al-Menhali e pesquisadores (2015) avaliaram o efeito do extrato das folhas de tomilho em células de câncer colorretal (linhagem

HCT116), obtendo como resultados a inibição da proliferação celular e diminuição da capacidade de adesão, migração e invasão destas células tumorais.

Já o OE de tomilho inibiu o crescimento celular em carcinoma de células escamosas da cavidade oral (SERTEL *et al.*, 2011), e dentre dez OEs analisados por Zu *et al.* (2010), o de tomilho foi o que apresentou maior citotoxicidade frente a três linhagens de células tumorais humanas testadas: PC-3 (próstata), A549 (pulmão) e MCF-7 (mama).

Em um recente estudo, Kubatka *et al.* (2019) avaliaram o efeito do OE tomilho em células de adenocarcinoma mamário (linhagens MCF-7 e MDA-MB-231) e observaram morte celular por apoptose induzida pelo OE. Os autores investigaram o mecanismo de ação e verificaram que houve diminuição nos níveis de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2; aumento na expressão de caspases executoras; aumento na expressão da PARP clivada e ainda observou-se aumento da população de células na fase sub-G0/G1, apontando para o bloqueio na progressão do ciclo celular e a indução de apoptose. Esses resultados corroboram com o mecanismo de ação apresentado por Gautam *et al.* (2014), o qual está descrito na Figura 3.

Os principais constituintes do OE de tomilho incluem o timol e o *p*-cimeno (NIKOLIC *et al.*, 2014). Existem relatos da atividade citotóxica do timol em linhagens tumorais de câncer gástrico (AGS), que apresentaram redução da viabilidade de maneira dose dependente após o tratamento com o composto (KANG *et al.*, 2016). O timol também se apresentou como um potencial antitumoral sobre células de câncer colo retal (linhagem HCT-116), induzindo danos ao DNA e a produção de EROs, consequentemente, levando as células a morte por apoptose (CHAUHAN *et al.*, 2017).

Por serem misturas complexas de substâncias que incluem componentes orgânicos voláteis, os OEs possuem diversas propriedades farmacológicas, grande parte em função de sua volatilidade, tornando-os ideais para nebulizações e inalações (EDRIS, 2007). Essa propriedade, especificamente para o tratamento do câncer de pulmão, torna-se muito interessante, já que por conta do óleo ser volátil os componentes podem ser entregues ao tecido pulmonar diretamente por inalação, o que provavelmente minimizaria os efeitos colaterais (SEAL *et al.*, 2012).

3.2.3 Óleos essenciais e compostos isolados associados à radiação

Uma das estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer é a radioterapia. No momento em que a radiação ionizante é incidida sobre os tecidos,

interage com as biomoléculas, podendo levar a danos no DNA. Após a irradiação, os danos continuam acontecendo por meio de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela radiólise da água, tais como o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a hidroxila (OH^-). As EROs interagem com moléculas como DNA, proteínas ou membranas lipídicas, resultando em danos celulares, disfunções e até morte celular. No entanto, esses danos podem também ser observados em células não neoplásicas, o que leva a uma série de efeitos adversos (REISZ *et al.*, 2014).

Desde que o dano celular é atribuído principalmente aos efeitos dos radicais livres, substâncias com propriedades de neutralizar estes radicais podem conferir proteção contra os efeitos adversos da radiação ionizante (HOSSEINIMEHR, 2007). Antioxidantes evitam os danos celulares induzidos por radicais livres ao promoverem sua neutralização e, portanto, podem atuar como radioprotetores. As células apresentam enzimas antioxidantes endógenas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathione redutase (GSH), que são capazes de eliminar os produtos da radiólise da água. No entanto, quando os radicais livres e as EROs aumentam no sistema biológico após a exposição à radiação, o sistema endógeno é incapaz de proteger as células (FISCHER, SEO, & THOMAS, 2018). À vista disso, é importante a presença de antioxidantes exógenos para neutralizar a ação dessas moléculas, que pode ocorrer diretamente pela inibição dos radicais livres ou pelo aumento na expressão das enzimas antioxidantes endógenas (ARCHANA *et al.*, 2009; FISCHER; SEO; THOMAS, 2018; SAMARTH; SAMARTH; MATSUMOTO, 2017).

Sabe-se que os OEs apresentam grande capacidade antioxidante (BAKKALI *et al.*, 2008). O OE de gengibre, por exemplo, foi avaliado como radioprotetor em ratos; o estudo forneceu evidências de que o OE de gengibre diminuiu os efeitos induzidos pela radiação a níveis molecular, celular e tecidual, neutralizando os efeitos diretos e indiretos da radiação (JEENA *et al.*, 2016).

Alguns compostos isolados de OEs também têm sido pesquisados como radioprotetores devido ao fato de serem altamente antioxidantes. O carvacrol é um deles e apresentou ter a capacidade de neutralizar os radicais livres produzidos e assim proteger linfócitos dos danos celulares induzidos pela radiação (ARIVALAGAN

et al., 2015). Em outra pesquisa, na qual se avaliou o potencial radioprotetor do carvacrol e também do timol, verificou-se que o pré-tratamento com ambos os compostos protegeu os ovários de ratas expostas à radiação (MAHRAN *et al.*, 2019).

A capacidade citoprotetora do timol foi avaliada em glândulas salivares de ratos que foram expostos à radiação ionizante. Verificou-se que o composto protegeu significativamente a disfunção aguda e crônica nas glândulas salivares, avaliados no 3º e 70º dia após a irradiação (ABEDI *et al.*, 2016).

O efeito *in vitro* do timol também já foi avaliado em fibroblastos de pulmão expostos à radiação. Os autores observaram que o composto protege as células dos danos causados pela radiação e explicam que o timol é um potente antioxidante com capacidade de captura de radicais livres por conta da presença do grupo hidroxila, elucidando assim o seu potencial efeito radioprotetor (ARCHANA *et al.*, 2009). Os mesmos pesquisadores analisaram o efeito do timol *in vivo*. Os resultados foram positivos, pois o pré-tratamento com o composto aumentou a taxa de sobrevivência dos animais, possivelmente por meio do aumento dos níveis de antioxidantes endógenos e atividade de captura dos radicais livres gerados pela radiação (ARCHANA; NAGESHWAR RAO; SATISH RAO, 2011).

Por outro lado, existem relatos de alguns compostos isolados de OEs que apresentaram potencial radiosensibilizador, atuando de maneira sinérgica com a radiação e, portanto, promovendo maior redução da viabilidade de células tumorais. O pré-tratamento com o monoterpeno álcool perílico, presente, por exemplo, no OE de hortelã e frutas cítricas, resultou em uma sensibilização das células do câncer de próstata (linhagens DU145 e PC3) à radiação, ocorrendo maior número de morte celular (RAJESH; HOWARD, 2003). O mesmo composto agiu como radiosensibilizador de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (linhagens SCC-25, HTB-43 e BroTo) (SAMAILA *et al.*, 2004).

O tratamento com o componente monoterpênico timoquinona presente no OE de *Nigella sativa* L., resultou em aumento significativo da citotoxicidade induzida por radiação em células de carcinoma de mama humano (linhagens MCF7 e T47D) (VELHO-PEREIRA *et al.*, 2011).

Outro composto, o β -elemeno, um sesquiterpeno, deixou as células de adenocarcinoma de pulmão (A549) mais suscetíveis aos danos causados pela radiação, aumentando a indução de danos ao DNA em células irradiadas e inibindo a

reparação de danos induzidos por radiação (LI *et al.*, 2011). O mesmo grupo de pesquisadores avaliou o efeito do composto associado a radiação em tumores xenográficos de adenocarcinoma de pulmão, observando que o potencial radiosensibilizante do β -elemeno se mantém quando analisado *in vivo* (LI *et al.*, 2012).

Cabe ressaltar que todas as pesquisas aqui citadas relatam o efeito *in vitro* do timol solubilizado em solvente e adicionado diretamente no meio de cultivo celular e, *in vivo*, quando administrado por meio de injeção intraperitoneal ou por gavagem/oralmente. Portanto, não foram encontrados trabalhos que relatem a avaliação da fase vapor OE de tomilho e seus compostos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Óleo essencial de tomilho

O OE de tomilho, adquirido da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda., foi extraído por destilação de folhas e flores da espécie *Thymus vulgaris* L., de origem da Espanha. O OE foi armazenado à 4°C em microtubos envoltos em papel alumínio. Uma amostra foi enviada para o Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul para a realização da análise quantitativa em cromatografia gasosa (CG) e análise qualitativa em espectrômetro de massas (CG/EM), com a finalidade de identificar os compostos presentes no OE e compará-los com os dados da literatura.

A análise em CG foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado Hewlett Packard 6890 Series, equipado com software HP Chemstation. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-Innowax (30 m x 320 µm) 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). Temperatura da coluna, 40°C (8 min) para 180°C a 3°C/min, 180-230°C a 20°C/min, 230°C (20 min); temperatura do injetor 250°C; razão de split 1:50; detector de ionização de chama com temperatura de 250°C; gás de arraste H₂ (34KPa); volume injetado 1mL diluído em hexano (1:10).

A análise em CG/EM foi realizada em um cromatógrafo gasoso acoplado a detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973, equipado com software HP Chemstation e espectroteca Wiley 275. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-Innowax (30 m x 250 µm) 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). Temperatura da coluna, 40°C (8 min) para 180°C a 3°C/min, 180-230°C a 20°C/min, 230°C (20 min); interface 280°C; split ratio 1:100; gás de arraste He (56 KPa); razão de fluxo: 1,0 mL/min.; energia de ionização 70 eV; volume injetado 0,4 mL diluído em hexano (1:10). A identificação se deu por comparação com os espectros de massas da biblioteca do equipamento e pelo cálculo do índice do Kovats, com o uso de uma solução de alcanos de C₈ a C₂₁.

A fim de avaliar o efeito da fase vapor do OE de tomilho, inicialmente se preparou uma solução estoque na concentração de 100 mg/mL, utilizando a

densidade do OE (915 mg/mL) para realização dos cálculos. Para solubilizar o OE foi utilizada uma mistura de dois solventes, etanol P.A. e propilenoglicol na proporção 75% e 25%, respectivamente (solução veículo). A partir desta solução utilizou-se solução salina (NaCl, 0,9%) para fazer as diluições e obter as concentrações a serem testadas.

O timol foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich™ (St. Louis, USA). Para avaliar a citotoxicidade, o composto foi solubilizado em etanol P.A. (50 mg/mL) conforme instruções do fabricante e foi diluído em diferentes concentrações utilizando solução salina 0,9%.

4.2 Linhagens celulares e condições de cultivo

A linhagem MRC-5, fibroblastos de pulmão humano, foi adquirida do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz. As células foram cultivadas em meio MEM, pH 7,4, suplementado com 15% (v/v) de soro fetal bovino (SFB - Gibco), 2mM de L-glutamina (Vetec), 1mM de piruvato de sódio (Sigma Aldrich), 2g/L de bicarbonato de sódio (Vetec) e 1 mL/L de antibiótico penicilina e estreptomicina - 100 U/mL e 10 mg/mL, respectivamente (Sigma Aldrich).

A linhagem A549, derivada de adenocarcinoma de pulmão humano, foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro e foi cultivada em meio DMEM (Gibco), contendo SFB a 10% (v/v), 3,5 g/L de glucose, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e 1 mL/L de antibiótico (penicilina e estreptomicina - 100 U/mL e 10 mg/mL, respectivamente).

Já a linhagem NCI-H292, que compreende células de carcinoma pulmonar mucoepidermoide, foi adquirida do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz e foi cultivada em meio RPMI-1640 (Gibco) contendo 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de SFB e 1 mL/L de antibiótico (penicilina e estreptomicina - 100 U/mL e 10 mg/mL, respectivamente).

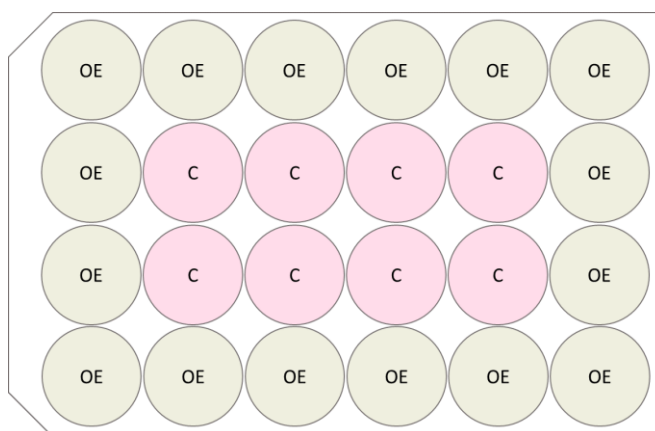
As culturas foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%.

4.3 Determinação da citotoxicidade da fase vapor do OE de tomilho e timol

Para avaliar o efeito dos compostos voláteis do OE de tomilho bem como do composto timol, utilizou-se a estratégia metodológica descrita por Seal *et al.* (2012), com modificações (Figura 4). As células foram semeadas na concentração de 1×10^4 células/poço nos 8 poços centrais de placas de 24 poços, as quais foram mantidas em incubadora por 24 h para total adesão celular. Nos 16 poços desprovidos de células foram adicionados 1000 μL do OE ou timol diluídos em solução salina (NaCl 0,9%) em diferentes concentrações: 62,5; 125; 250; 375; 500 e 1000 $\mu\text{g/mL/poço}$ (OE) e 31,25; 62,5; 125; 250; 375 e 500 $\mu\text{g/mL/poço}$ (timol).

Cada placa recebeu o tratamento em apenas uma concentração, da mesma forma que o controle foi feito em uma placa em separado/isolada. A placa controle dos experimentos com o OE recebeu solução salina 0,9% associada a uma solução complementar (veículo + salina na mesma proporção da solução estoque) para que ficasse com a mesma concentração da solução veículo adicionada nas demais placas. Com a mesma finalidade, a placa controle dos experimentos com o timol recebeu etanol P.A. associado a solução salina 0,9%. Após, as placas foram incubadas por 72 h para os ensaios tipo dose-resposta e por 24 h e 48 h para os ensaios tipo tempo-resposta.

Figura 4 - Ilustração da estratégia de semeadura utilizada para avaliar o efeito da fase vapor do OE de tomilho e de seu composto majoritário, timol.



(C) poços contendo células; (OE) poços contendo o óleo essencial de tomilho ou timol. Dimensões da placa (L x A): 127,5 x 22,45 mm
Fonte: A autora.

4.3.2 Ensaio de redução de MTT

Esse ensaio colorimétrico é uma reação de redução química que permite avaliar indiretamente a viabilidade celular. O anel tetrazólio do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) é clivado nas mitocôndrias ativas pelas suas desidrogenases, formando cristais de formazan de coloração violeta, que podem ser lidos por espectrofotometria quando solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (MOSMANN, 1983).

Após os tempos de tratamento, o meio de cultivo foi removido e 400 µL da solução de MTT a 0,5 mg/L (Sigma Aldrich) foi adicionada aos poços. As placas foram incubadas por 2 h até a observação dos cristais de formazan e então a solução de MTT foi desprezada e 200 µL de DMSO (Vetec) foram adicionados para solubilizar os cristais. O conteúdo foi homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços a fim de realizar a leitura espectrofotométrica da absorbância em comprimento de onda de 570 nm (Biotek, µQuant). A viabilidade celular (%) foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Abs média do controle}} \times 100$$

4.3.3 Ensaio de coloração de proteínas

A viabilidade celular também foi determinada pelo ensaio colorimétrico empregando-se a sulforodamina B (SRB). Após o tempo de incubação do tratamento, o sobrenadante foi desprezado, as células foram lavadas com tampão de fosfato de sódio pH 7,4; em seguida foi adicionado 200 µL de ácido tricloroacético 10% e então as placas foram mantidas na geladeira durante 30 minutos. Logo após, foi feita a lavagem dos poços com água destilada. Passadas 24 h, adicionou-se 200 µL de solução de SRB (Sigma Aldrich) 0,2% e após 30 minutos as placas foram lavadas com ácido acético 1%. Depois da secagem dos poços, 150 µL de TrisBase 10 mM foram adicionados aos poços para solubilizar o conteúdo e então 100 µL de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços (PAPAZISIS *et al.*, 1997). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada nos comprimentos de onda de 520 nm e 620 nm e, para a normalização dos dados, o valor de leitura em 620 nm foi subtraído do valor de 520 nm e então a viabilidade celular (%) foi calculada de acordo com a equação abaixo.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Abs em } 520\text{nm} - \text{Abs em } 620\text{nm}}{\text{Abs média do controle}} \times 100$$

4.3.4 Determinação dos valores de CIV₅₀ e índice de seletividade da fase vapor do OE de tomilho e do timol

A concentração do OE de tomilho e do timol, em fase líquida, capaz de gerar vapor que reduz a viabilidade celular em 50% (CIV₅₀) é expressa em µg/mL/poço, considerando a estratégia de semeadura ilustrada na Figura 4. Os valores de CIV₅₀ foram calculados por meio de regressão não linear no *Software* GraphPad Prism 5.01 para cada linhagem celular e para os três períodos de tratamento.

A fim de verificar se a fase vapor do OE de tomilho, bem como do timol, induzem a morte celular de maneira seletiva, os testes de citotoxicidade foram realizados também com a linhagem MRC-5, descrita como fibroblastos de pulmão humano não tumorais.

O índice de seletividade (IS) é calculado pela razão entre o valor da CIV₅₀ da linhagem tumoral e o valor da CIV₅₀ da linhagem normal (equação abaixo). Valores de IS menores que 2 indicam seletividade não-específica (AYESH; ABED; FARIS, 2014).

$$IS = \frac{CIV_{50} \text{ células não tumorais}}{CIV_{50} \text{ células tumorais}}$$

4.4 Avaliação do efeito da fase vapor do timol em células submetidas a radiação

Para avaliar os efeitos da fase vapor do timol em associação à radiação, foram realizados experimentos prévios de citotoxicidade na ausência de radiação, em ensaios de 6 h de tratamento e empregando as concentrações de 31,25; 62,5 e 125 µg/mL/poço do composto. Esses ensaios foram necessários porque seria interessante que no momento da irradiação sobre as células, o timol já estivesse volatilizado e solubilizado nos poços centrais, contudo, sem gerar redução na viabilidade celular. Para tanto, foi utilizada a mesma estratégia metodológica descrita no item 4.3. Após as 6 h de tratamento foi determinada a viabilidade celular, conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2.

Com a finalidade de saber qual dose de radiação utilizar, as três linhagens, MRC-5, A549 e H292, foram irradiadas com 3, 6, 9 e 12 Gy (Gray) de radiação geradas por acelerador linear com energia de 6 MV de fótons. Após 24 h foi realizado o ensaio de redução de MTT para avaliar a viabilidade celular. A partir da análise destes resultados foi possível escolher a dose adequada para prosseguir com os experimentos de associação da fase vapor do timol e radiação.

Uma vez que as diferentes linhagens celulares possuem tempos de dobramento distintos, cada linhagem foi semeada em uma concentração diferente: 3×10^4 células/mL da linhagem MRC-5; $2,5 \times 10^4$ células/mL da A549 e 2×10^4 células/mL da H292. Foi utilizada a mesma estratégia metodológica do item acima, com as concentrações de 31,25; 62,5 e 125 µg/mL/poço do timol.

Após as 6 h de exposição ao vapor do timol, as células foram levadas até o Complexo ISPON (composto pelo Instituto Sul Paranaense de Oncologia -ISPON - e pelo Instituto Sul Paranaense de Radioterapia - ISPAR) onde foram irradiadas com a dose de 9 Gy por meio de acelerador linear com energia de 6 MV de fótons. Em seguida, as placas voltaram a ser incubadas a 37°C por mais 48 h. Cabe ressaltar que o tratamento com o vapor do timol foi mantido durante este período. Foram realizados os ensaios de redução de MTT e coloração por SRB para determinar a viabilidade celular conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2.

4.5 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software* GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, EUA). A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de variância (*One-Way* ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey ou por meio do teste t, com intervalo de confiança em 95% ($p \leq 0,05$).

A citotoxicidade foi expressa em porcentagem e a concentração que gera vapor capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (CIV₅₀) foi calculada por meio de regressão não linear no *Software* GraphPad Prism 5.01.

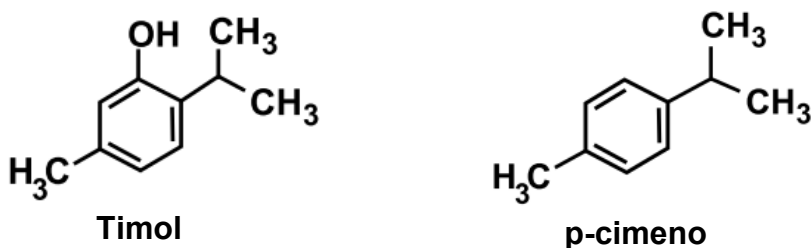
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do óleo essencial de tomilho via CG/EM

Por meio da análise cromatográfica foram identificados como compostos majoritários o timol (41,84%) e o *p*-cimeno (32,67%) (Figura 5), ambos monoterpênicos. Os demais compostos identificados estão descritos na Tabela 1. Na figura 6 está apresentado o cromatograma do OE de tomilho, onde se observa os picos dos compostos presentes e seu tempo de retenção.

Os mesmos compostos majoritários (timol e *p*-cimeno) do OE de tomilho foram identificados por outros pesquisadores, com algumas diferenças na concentração de cada composto. Nas análises de Nikolic *et al.* (2014) o timol aparece com 49,1% e o *p*-cimeno com 20%; Porte & Godoy (2008) verificaram 44,7% de timol e 18,6% de *p*-cimeno e no trabalho de Soković *et al.* (2009) o timol aparece com 48,9% e o *p*-cimeno com 19% da composição total do OE. Além disso, de acordo com a Farmacopeia Brasileira, a concentração do timol pode variar entre 26 e 55% (ANVISA, 2019). O terceiro composto majoritário do OE de tomilho, γ -terpineno (7,29% - Tabela 1), foi identificado como o segundo de maior composição por outros pesquisadores (HUDAIB *et al.*, 2002; PIRBALOUTI; HASHEMI; GHAFAROKHI, 2013; SHABNUM; WAGAY, 2011)

Figura 5 - Estrutura química do timol e *p*-cimeno.



Fonte: Jamali *et al.* (2018).

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de tomilho.

Composto	TR (min)	IRL calc	IRL lit	Concentração (%)
^a α -pineno	14,225	1019,848	1022	3,09
^a α -tujeno	14,561	1026,081	1025	0,18
^a Canfeno	16,57	1063,346	1065	0,84
^a β -pineno	18,865	1105,825	1108	0,1
^a β -tujeno	20,63	1138,057	1133	0,12
^a Mirceno	22,266	1167,933	1166	1,53
^a α -terpineno	22,989	1181,136	1188	0,39
^a Limoneno	24,018	1199,927	1199	0,2
^b 1,8-cineol	24,399	1207,268	1210	0,58
^a γ -terpineno	26,609	1249,875	1240	7,29
^a <i>p</i> -cimeno	28,014	1276,962	1270	32,67
^b Cânfora	39,727	1527,536	1531	0,77
^b Linalol	40,745	1551,494	1551	4,32
^c β -cariofileno	43,16	1608,832	1604	1,79
^b Isoborneol	45,963	1678,767	1670	0,29
^b Borneol	47,255	1711,581	1715	0,85
^d Óxido de cariofileno	56,923	2004,615	2008	0,16
^b Timol	60,529	2199,286	2187	41,84
^b Carvacrol	61,117	2230,488	2225	2,43
TOTAL				99,44
^a Monoterpeno hidrocarbonado				46,41
^b Monoterpeno oxigenado				51,08
^c Sesquiterpeno hidrocarbonado				1,79
^d Sesquiterpeno oxigenado				0,16

TR (min): tempo de retenção em minutos; IRL calc: índice de retenção linear calculado; IRL lit: índice de retenção linear da literatura.

Fonte: A autora.

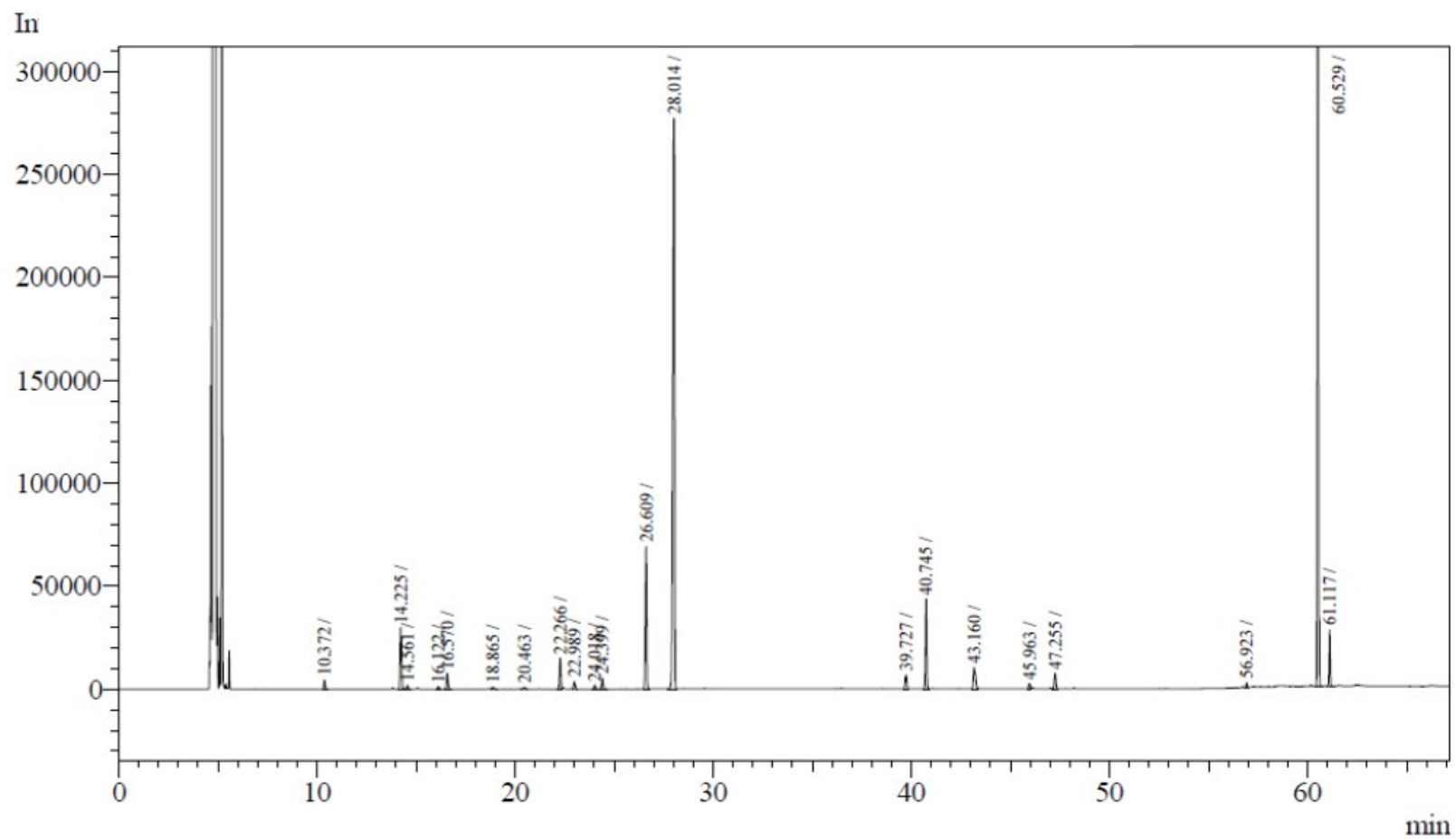
As diferenças da composição química do OE devem-se ao fato de que a porcentagem dos componentes pode variar durante o ciclo vegetativo, conforme variações sazonais, parte da planta e condições de cultivo (STAHL-BISKUP, 1991). Por exemplo, Hudaib *et al.* (2002) analisaram a composição química do OE de tomilho

em diferentes épocas do ano e em plantas de diferentes idades, verificando que a concentração de compostos monoterpênicos variam conforme a idade e a época de coleta da planta. Desta forma, a composição química do OE utilizado neste trabalho está de acordo com o descrito pela literatura.

Cabe ressaltar que os compostos majoritários do OE de tomilho já possuem diferentes atividades biológicas descritas na literatura. O timol apresentou potencial citotóxico para as linhagens celulares de carcinoma gástrico (AGS), leucemia (HL-60) e melanoma (B16-F10) (KANG *et al.*, 2016; DEB *et al.*, 2011; SATOOKA; KUBO, 2012), sendo também citotóxico em células de carcinoma de pulmão H1299, tanto para a linhagem parental quanto para a derivada, que apresentava resistência a múltiplas drogas (OZKAN; ERDOGAN, 2012). Por outro lado, Archana *et al.* (2009) verificaram o efeito citoprotetor do timol em fibroblastos de pulmão (V79).

O segundo composto de maior porcentagem de concentração do OE de tomilho, o *p*-cimeno (32,67%), também já foi avaliado quanto ao seu potencial antitumoral, no entanto, este composto não reduziu a viabilidade de células tumorais de maneira significativa (JAMALI *et al.*, 2018).

Figura 6 - Cromatografia gasosa do óleo essencial de tomilho.

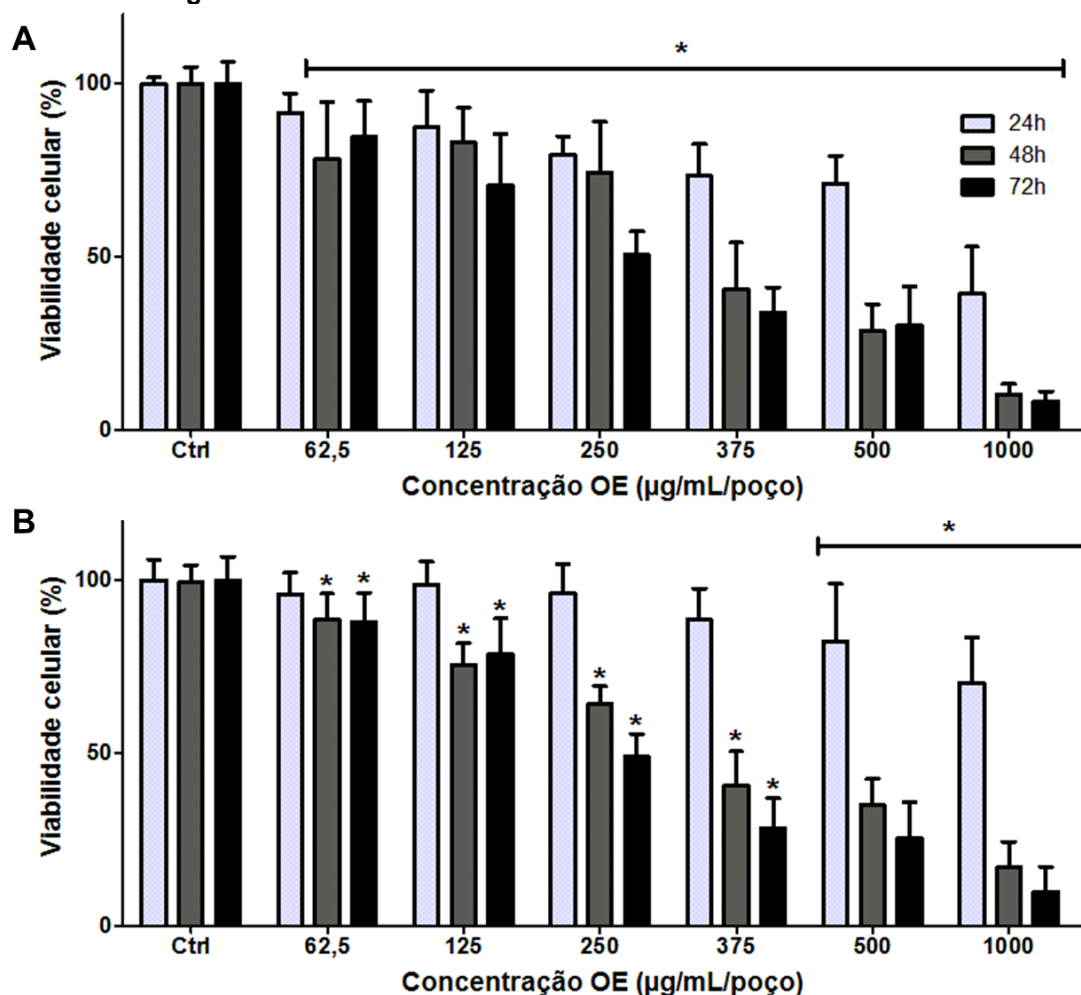


Fonte: A autora

5.2 Determinação da citotoxicidade da fase vapor do OE de tomilho e do composto majoritário timol

O efeito da fase vapor do OE de tomilho e do composto timol sobre a viabilidade celular foi avaliada pelos métodos de redução de MTT e coloração empregando a SRB. Os resultados obtidos com a linhagem tumoral A549 estão expressos na Figura 7, onde é possível observar que a fase vapor do OE de tomilho promoveu redução na viabilidade celular em todas as concentrações testadas nos períodos de tratamento de 48 e 72 h de maneira dose dependente. O perfil de tempo dependência também foi observado, pois há diferença estatística entre os valores de CIV₅₀ obtidos entre os tempos de 24 e 48 h, todavia não entre 48 e 72 h (Tabela 2).

Figura 7 - Efeito da fase vapor do OE de tomilho em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem A549.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT (A) e coloração por SRB (B) após 24, 48 e 72 h de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. * representa diferença estatística em relação ao controle (solução veículo + salina 0,9%) obtida por *One-Way* ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

Os valores da concentração que causaram redução da viabilidade celular em 50% (CIV_{50}) no período de 72h foram de $244,2 \pm 28 \mu\text{g/mL/poço}$ quando empregado o método de redução do MTT e $247,7 \pm 38,6 \mu\text{g/mL/poço}$ com a SRB, os demais valores de CIV_{50} estão descritos na tabela 2. Sertel *et al.* (2011) encontram o valor de concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (CI_{50}) de $369 \mu\text{g/mL}$ quando avaliaram a citotoxicidade do OE de tomilho frente à uma linhagem de carcinoma de células escamosas da cavidade oral, no entanto, cabe ressaltar que os autores testaram a fase líquida do OE, adicionado diretamente no meio de cultivo das células.

Tabela 2 - Valores de CIV_{50} para as linhagens A549 e H292 após tratamento com fase vapor do OE de tomilho.

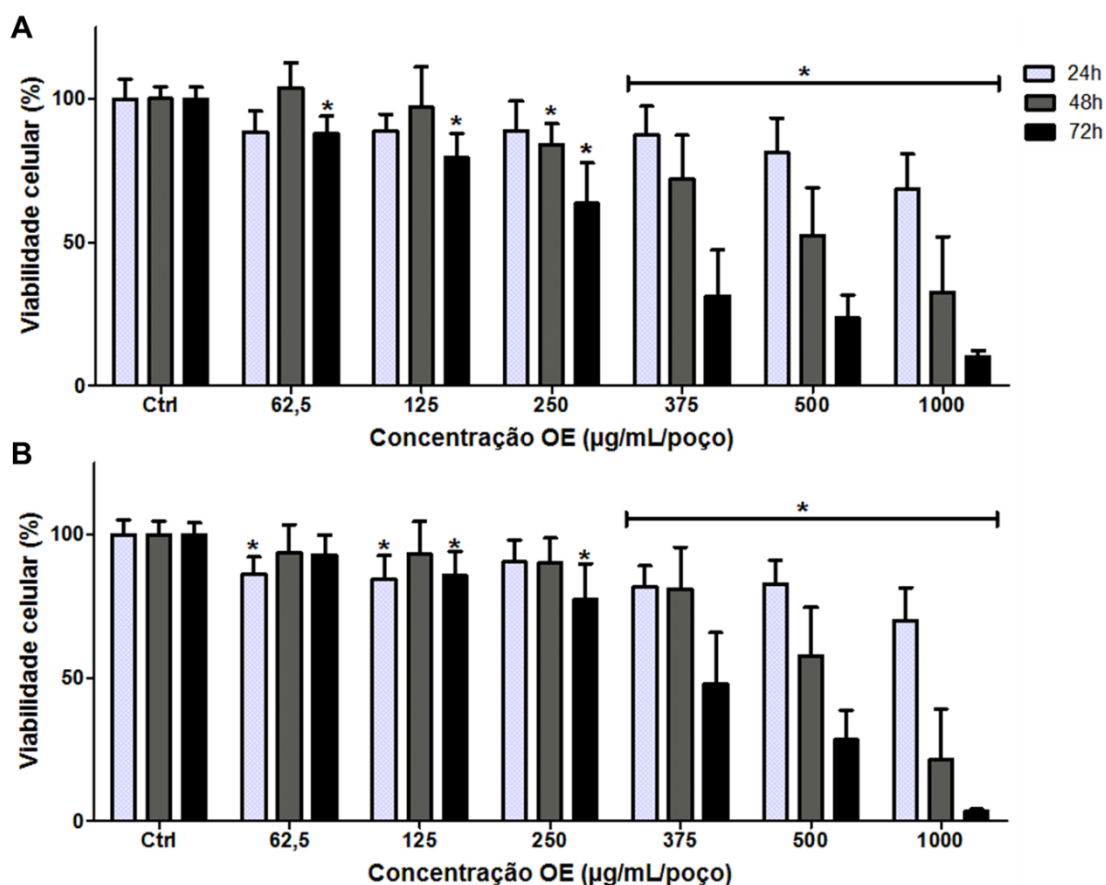
	A549		H292	
	MTT	SRB	MTT	SRB
24h	$806,8 \pm 244,3^a$	ND	ND	ND
48h	$305,2 \pm 97,6^b$	$320,5 \pm 47,0$	$648 \pm 282,6$	$659,6 \pm 196,9$
72h	$244,2 \pm 28^b$	$247,7 \pm 38,6$	$292,4 \pm 65,5$	$353,5 \pm 78$

Os valores de CIV_{50} ($\mu\text{g/mL/poço}$) são expressos como média $\pm$ desvio padrão, obtidos dos experimentos de 24, 48 e 72 h de tratamento com fase vapor do OE de tomilho. Os valores foram calculados por regressão não linear no *Software* GraphPad Prism 5.01. Letras diferentes representam diferença estatística entre os tempos obtida por *One-Way* ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ou teste t ($p < 0,05$). ND = não determinado.

Fonte: A autora.

Em comparação à linhagem A549, a linhagem H292 se mostrou mais resistente ao tratamento com o vapor do OE de tomilho, especialmente nos períodos de 24 e 48 h, nos quais houve redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de $375 \mu\text{g/mL/poço}$ e $250 \mu\text{g/mL/poço}$, respectivamente (Figura 8). Essa diferença também pode ser observada por meio do valor de CIV_{50} para o período de 48 h, que foi de $648 \mu\text{g/mL/poço}$ para a H292 e $305,2 \mu\text{g/mL/poço}$ para a A549 (Tabela 2). Os valores de CIV_{50} para o período de tratamento de 72 h são de $292,4 \pm 65,5 \mu\text{g/mL/poço}$ com o MTT e $353,5 \pm 78 \mu\text{g/mL/poço}$ com a SRB.

Figura 8 - Efeito da fase vapor do OE de tomilho em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem H292.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT (A) e coloração por SRB (B) após 24, 48 e 72 h de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. * representa diferença estatística obtida por *One-Way ANOVA*, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

A linhagem H292, menos responsiva ao OE de tomilho, compreende células de carcinoma pulmonar mucoepidermoide, um subtipo raro de CPCNP que representa cerca de 0,2% dos tumores malignos de pulmão. O tratamento preconizado para este tipo de tumor é principalmente por meio de cirurgia, pois a resposta à quimioterapia e radioterapia é baixa (HSIEH *et al.*, 2017; XI *et al.*, 2012). A refratariedade desta linhagem não é devida a presença de proteínas que causam resistência a drogas. No trabalho de Galetti *et al.* (2015) foi avaliada a expressão de BCRP, do inglês *Breast Cancer Resistance Protein* (também conhecida como ABCG2), que é uma das proteínas de membrana da família ABC (*ATP-binding cassette*) responsáveis por bombear para fora da célula algumas substâncias desconhecidas e, assim, causar resistência a drogas. Dentre as linhagens analisadas, a H292 não apresenta a BCRP e foi responsiva ao tratamento com Gefitinib.

A linhagem A549, que é derivada de adenocarcinoma de pulmão humano, também responde fracamente aos quimioterápicos, o que é justificado pelo fato de apresentar proteínas que causam resistência as drogas. Verificou-se que a linhagem expressa o gene *ABCB1* (MDR 1 – *Multidrug Resistance* 1), responsável por codificar a glicoproteína-P (LI *et al.*, 2017a). Em outra pesquisa foi verificado que a linhagem A549 também possui BRCP, o que a conferiu resistência ao Gefitinib (GALETTI *et al.*, 2015).

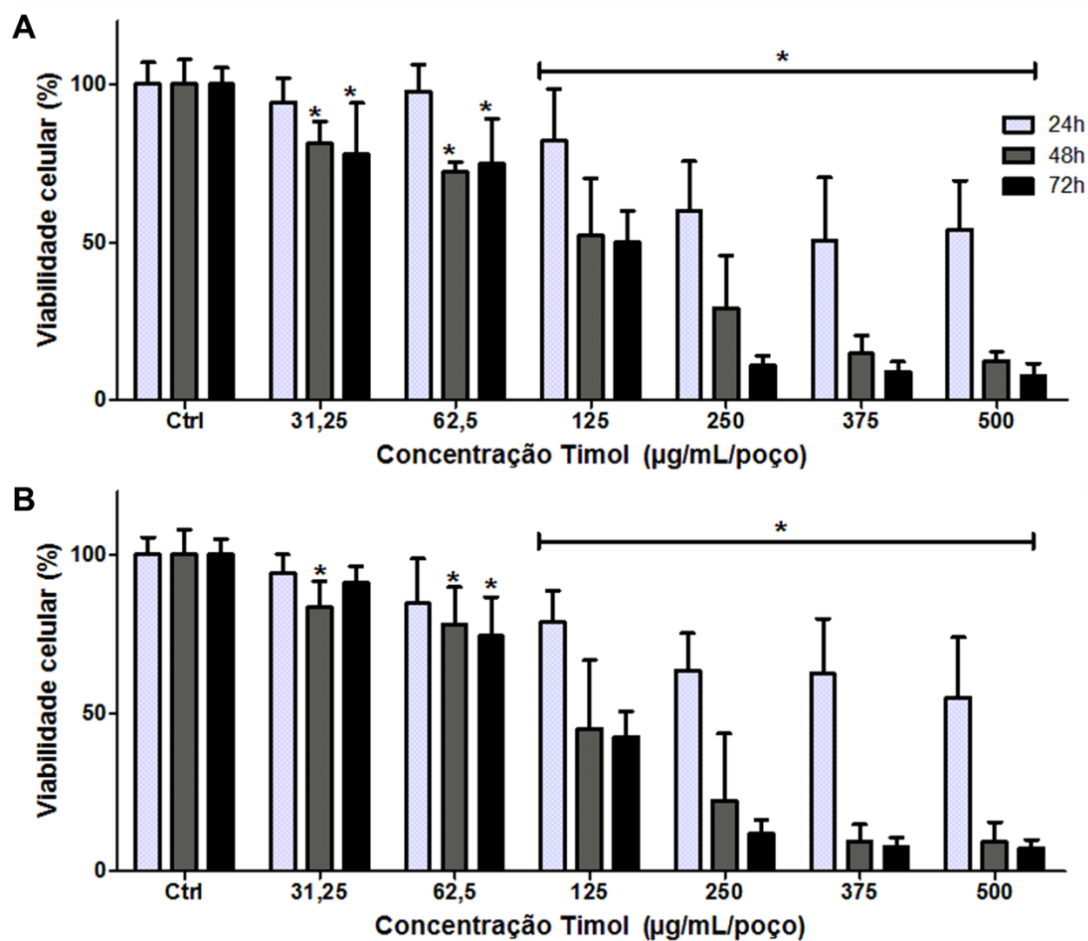
Nikolic *et al.* (2014) avaliaram o efeito do OE, em fase líquida, de três espécies do gênero *Thymus* nas linhagens tumorais de adenocarcinoma mamário (MCF-7), carcinoma de cólon (HCT-15), carcinoma de colo de útero (HeLa), carcinoma hepatocelular (HepG2) e carcinoma de pulmão de células não pequenas (NCI-H460). Os resultados variaram entre as diferentes linhagens e também entre os OEs das três espécies, havendo redução da viabilidade celular de maneira dose dependente em todas as linhagens. No entanto, o OE de *Thymus vulgaris* foi o que apresentou menor atividade citotóxica comparado ao OE das espécies *Thymus algenensis* e *Thymus serpyllum*, sendo esse último o que apresentou melhores resultados.

Em um outro estudo, no qual analisou-se o potencial citotóxico de dez OEs, o de tomilho foi o que apresentou maior citotoxicidade nas linhagens tumorais de pulmão (A549), próstata (PC-3) e mama (MCF-7) (ZU *et al.*, 2010).

Kubatka *et al.* (2019), avaliaram o efeito do OE de tomilho em células de adenocarcinoma mamário (linhagens MCF-7 e MDA-MB-231) e verificaram que houve morte celular por apoptose. Houve diminuição nos níveis de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, aumento na expressão de caspases executoras, aumento na expressão da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) clivada e, ainda, houve um aumento da população de células na fase sub-G0/G1, apontando para o bloqueio na progressão do ciclo celular e a indução de apoptose.

O composto timol volatilizado se mostrou mais citotóxico que o OE de tomilho para as duas linhagens tumorais, promovendo uma redução de mais de 80% da viabilidade celular na concentração de 250 µg/mL/poço no período de 72 h em ambas as linhagens (Figura 9 e 10). De acordo com o ensaio de redução de MTT realizado no período de tratamento de 72 h, os valores de CIV₅₀ para as linhagens A549 e H292 são de 107,8 ± 20 e 128,9 ± 11,7 µg/mL/poço, respectivamente (Tabela 3).

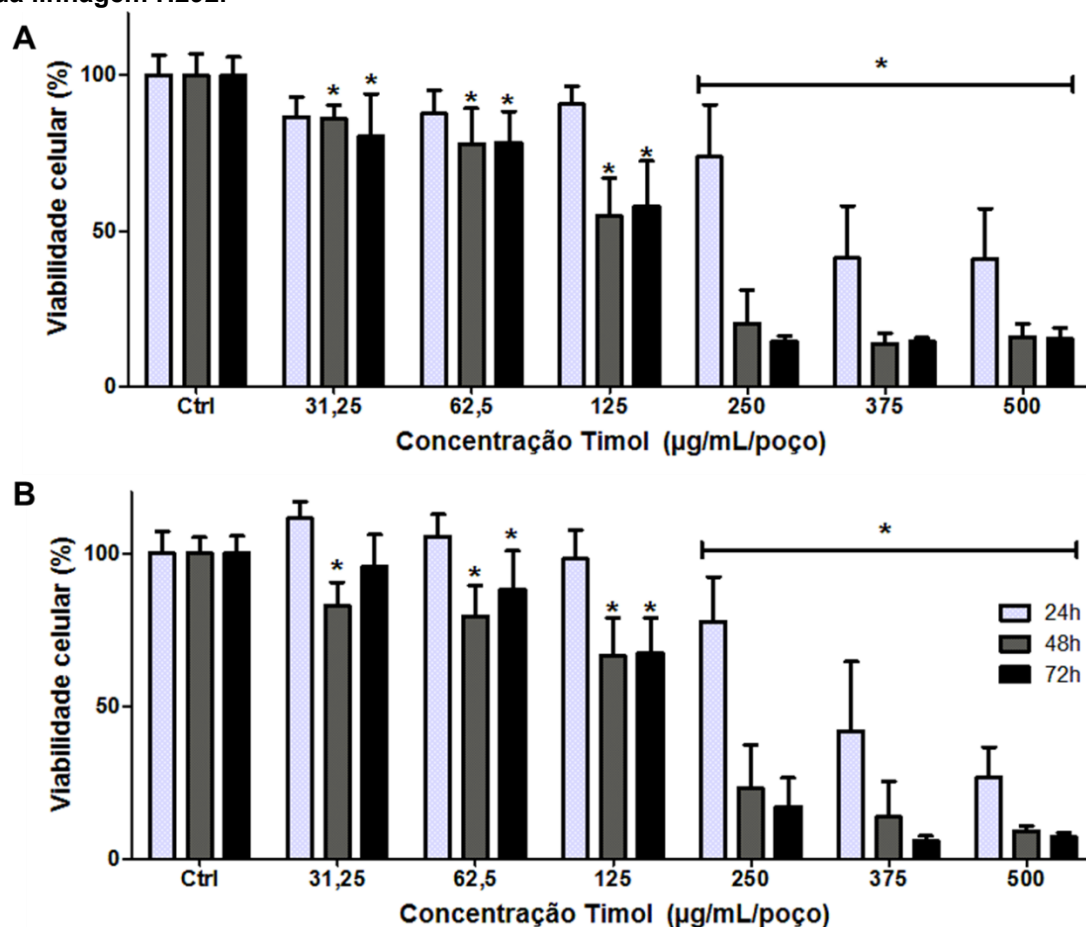
Figura 9 - Efeito da fase vapor do timol em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem A549.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT (A) e coloração por SRB (B) após 24, 48 e 72 h de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. * representa diferença estatística em relação ao controle (etanol P.A. + solução salina 0,9%) obtida por *One-Way ANOVA*, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

Figura 10 - Efeito da fase vapor do timol em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem H292.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT (A) e coloração por SRB (B) após 24, 48 e 72 h de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. * representa diferença estatística em relação ao controle (etanol P.A. + solução salina 0,9%) obtida por *One-Way ANOVA*, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

Tabela 3 - Valores de CIV₅₀ para a linhagens celulares A549 e H292 após tratamento com fase vapor do timol.

	A549		H292	
	MTT	SRB	MTT	SRB
24h	393,4 ± 124 ^a	359,6 ± 156 ^a	391,9 ± 130,1 ^a	354,4 ± 0,6 ^a
48h	150,1 ± 55 ^b	132 ± 65,4 ^{ab}	137,9 ± 34,1 ^b	157 ± 15,2 ^b
72h	107,8 ± 20 ^b	104,4 ± 12,2 ^b	128,9 ± 11,7 ^b	154 ± 16,9 ^b

Os valores de CIV₅₀ (µg/mL/poço) são expressos como média ± desvio padrão, obtidos dos experimentos de 24, 48 e 72 h de tratamento com fase vapor do timol. Os valores foram calculados por regressão não linear no *Software* GraphPad Prism 5.01. Letras diferentes representam diferença estatística entre os tempos obtidas por *One-Way ANOVA*, seguida pelo teste de Tukey ou teste t ($p < 0,05$). ND = não determinado.

Fonte: A autora.

Desde que a fase vapor do timol foi mais citotóxica que o vapor do OE, com valores de CI_{50} abaixo da metade dos valores de CI_{50} para o OE, acredita-se que, dentre os diversos compostos do OE de tomilho, o timol seja o principal responsável por causar morte celular, pois, além disso, este é o composto majoritário do OE de tomilho, constituindo cerca de 42% da composição.

Existem relatos da atividade citotóxica do timol, em solução, sobre linhagens tumorais. Kang *et al.* (2016) verificaram que o composto, nas concentrações de 15, 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$, reduziu a viabilidade de células de câncer gástrico de maneira dose dependente, induzindo apoptose por meio da via intrínseca.

Em outro estudo o efeito citotóxico do timol foi avaliado sobre a linhagem tumoral de pulmão H1299. Os valores de CI_{50} encontrados para os períodos de 24 e 48 h foram de 74,5 e 40 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os mesmos pesquisadores ainda desenvolveram uma linhagem resistente a drogas a partir da linhagem parental H1299, por meio de seleção gradual com concentrações crescentes de um quimioterápico. Eles fizeram isso com a finalidade de verificar se o efeito citotóxico do timol persistiria e observaram que o timol era ainda mais tóxico para a linhagem resistente do que para a linhagem parental (OZKAN; ERDOGAN, 2012).

O timol também se apresentou como um potencial antitumoral sobre células de câncer colo retal (linhagem HCT-116), induzindo danos ao DNA e a produção de EROs, consequentemente, levando as células a morte por apoptose (CHAUHAN *et al.*, 2017).

Em relação ao mecanismo de ação pelo qual o timol induz a morte celular, foi verificado que o tratamento com o composto causa apoptose em células de carcinoma gástrico humano, ocasionando alterações morfológicas, geração de EROs e despolarização de potenciais de membrana mitocondrial por meio da ativação de Bax, caspases e poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) (KANG *et al.*, 2016).

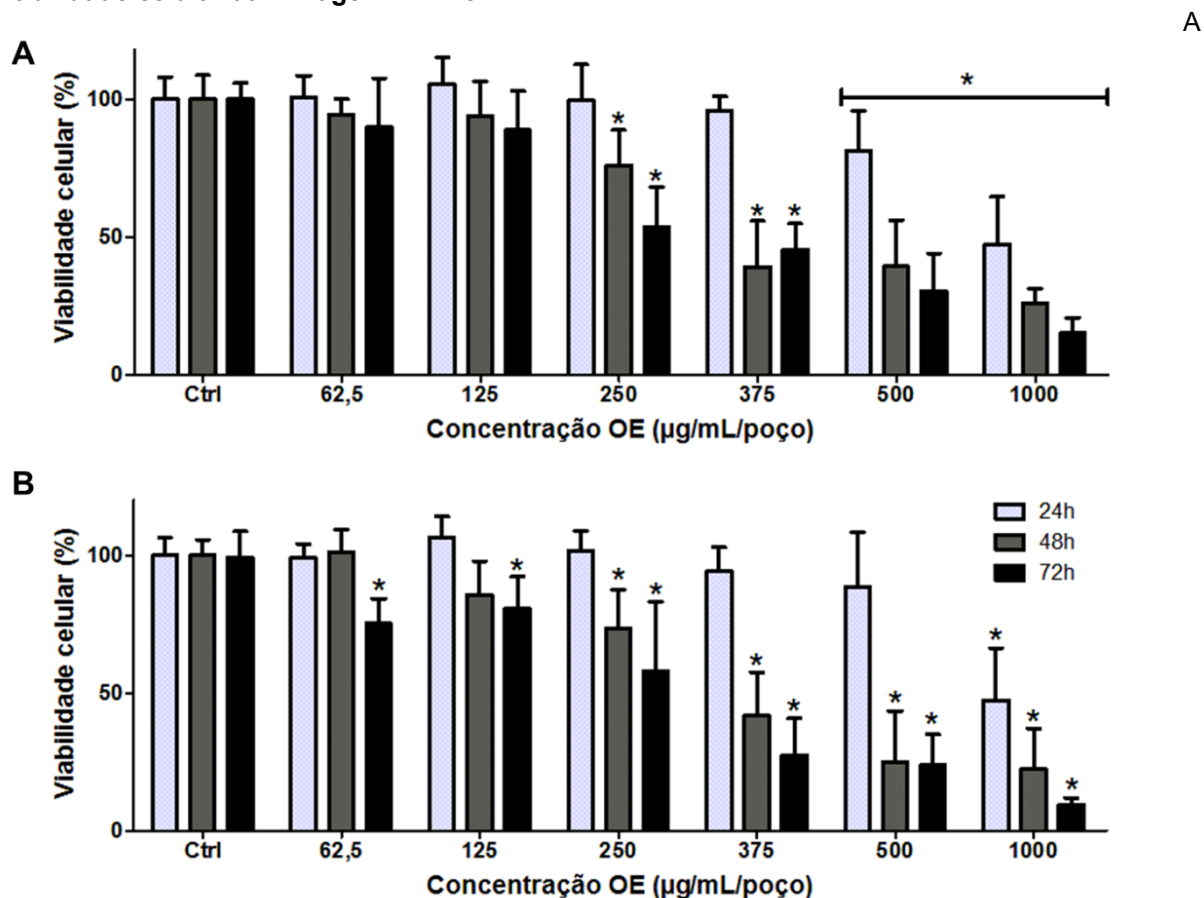
5.2.2 Determinação da seletividade da fase vapor do OE de tomilho e do timol

A fim de verificar se a fase vapor do OE de tomilho, bem como do timol, induzem a morte celular de maneira seletiva, os testes de citotoxicidade foram realizados também com a linhagem MRC-5, que se caracteriza por ser derivada de fibroblastos de pulmão humano não tumoral.

A fase vapor do OE de tomilho promoveu redução da viabilidade das células MRC-5 de maneira dose-dependente a partir da concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ /poço no

tratamento por 48 h (Figura 11). A CIV_{50} calculada para o período de tratamento de 72 h foi de $324,5 \pm 59,5$ $\mu\text{g/mL/poço}$ pelo ensaio de redução de MTT e $251,9 \pm 59$ $\mu\text{g/mL/poço}$ pelo método de coloração por SRB (Tabela 4). Assim como ocorreu para a linhagem A549, para a MRC-5 o perfil de tempo dependência foi evidenciado, pois houve diferença estatística entre os valores de CIV_{50} obtidos em tempos diferentes, exceto entre 48 e 72 h.

Figura 11 - Efeito da fase vapor do OE de tomilho em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem MRC-5.



viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT (A) e coloração por SRB (B) após 24, 48 e 72 h de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. * representa diferença estatística em relação ao controle (veículo + solução salina 0,9%) obtida por *One-Way* ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

Tabela 4 - Valores de CIV₅₀ para a linhagem MRC-5 após tratamento com fase vapor do OE de tomilho.

	MRC-5	
	MTT	SRB
24h	ND	392,5 ± 72,2 ^a
48h	245 ± 21,2 ^a	324,7 ± 25 ^a
72h	144 ± 20,5 ^b	109,5 ± 39 ^b

O valor de CIV₅₀ (µg/mL/poço) é expresso como média ± desvio padrão, obtidos dos experimentos de 24, 48 e 72 h de tratamento com fase vapor do OE de tomilho. Os valores foram calculados por regressão não linear no *Software* GraphPad Prism 5.01. Letras diferentes representam diferença estatística entre os tempos obtida por *One-Way* ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ou teste t ($p < 0,05$). ND = não determinado.

Fonte: A autora.

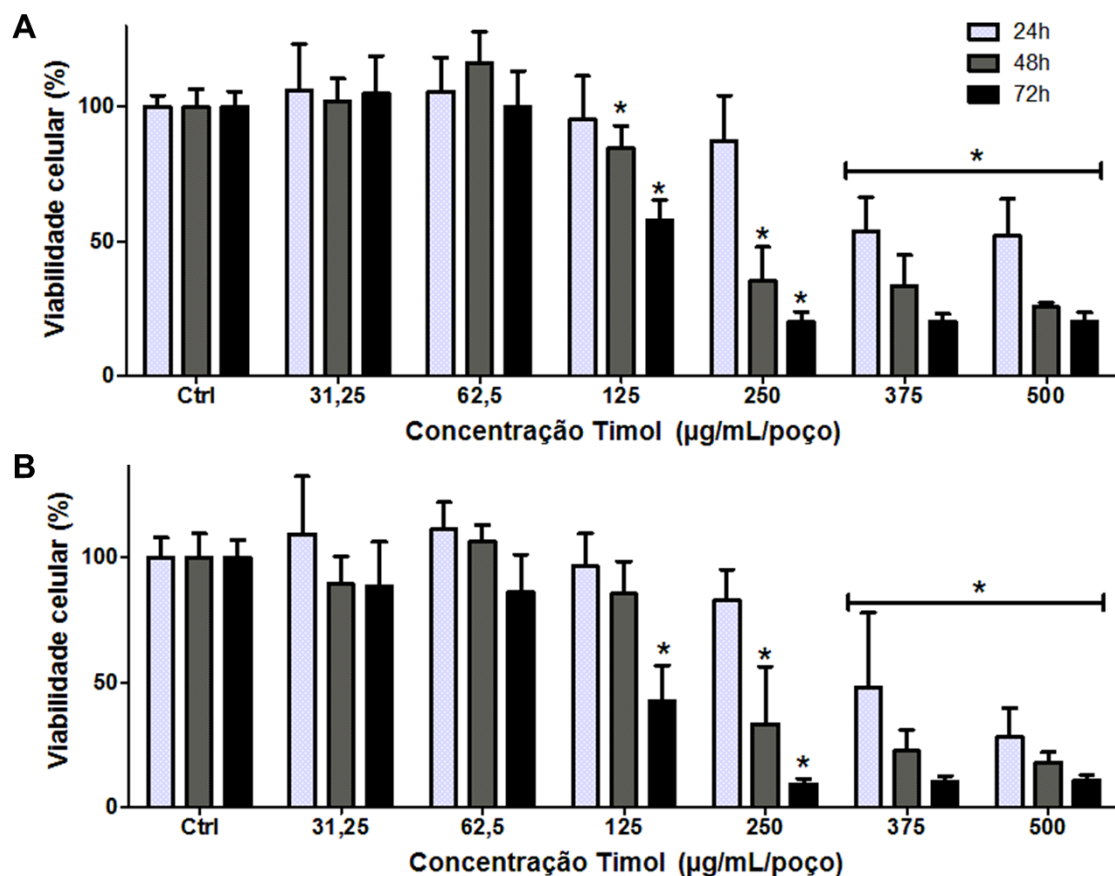
Comparando os resultados da linhagem MRC-5 com as duas linhagens tumorais, a primeira demonstra responder menos aos efeitos citotóxicos do vapor do OE, ou seja, ser mais refratária, pois houve redução significativa da viabilidade das células tumorais a partir da concentração de 62,5 µg/mL/poço nos períodos de tratamento de 48 e 72 h, enquanto que com as células não-tumorais foi a partir de 250 µg/mL/poço. Para a linhagem A549 a CIV₅₀ foi de 244,2 µg/mL/poço e para a H292 foi de 292,4 µg/mL/poço, enquanto que para a MRC-5 foi de 324,5 µg/mL/poço no período de tratamento de 72 h.

Para calcular o índice de seletividade (IS) emprega-se a razão entre o valor da CIV₅₀ da linhagem tumoral pelo valor da CIV₅₀ da linhagem não-tumoral (AYESH; ABED; FARIS, 2014). O vapor do OE de tomilho não causa morte celular de maneira seletiva, pois os valores do IS para ambas as linhagens tumorais foram menores que 2 e, de acordo com os pesquisadores Ayesh; Abed e Faris (2014), valores de IS menores que 2 indicam seletividade não-específica.

Assim como ocorreu para as linhagens tumorais, a fase vapor do timol se mostrou mais citotóxica do que o OE para as células MRC-5, com redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 125 µg/mL/poço no tempo de 72 h (Figura 12). O IS calculado para o período de tratamento de 48 h foi de 2,5 para a linhagem A549 e de 2 para as células H292 quando considerado os valores de viabilidade obtidos pelo método de coloração por SRB. Corroborando esse resultado, há diferença estatística entre o valor de CIV₅₀ da linhagem MRC-5 e das duas linhagens tumorais no período de 48 h (Tabela 5). Tais resultados permitem

considerar que a fase vapor do timol apresenta menor toxicidade às células normais do que às tumorais.

Figura 12 - Efeito da fase vapor do timol em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem MRC-5.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT (A) e coloração por SRB (B) após 24, 48 e 72 h de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. * representa diferença estatística em relação ao controle (etanol P.A. + solução salina 0,9%) obtida por *One-Way ANOVA*, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

Tabela 5 – Comparação entre os valores de CIV₅₀ da linhagem MRC-5 e linhagens tumorais (A549 e H292) obtidos dos experimentos com fase vapor do timol.

	A549		H292		MRC-5	
	MTT	SRB	MTT	SRB	MTT	SRB
48h	150,1 ± 55	132 ± 65,4*	137,9 ± 34,1*	157 ± 15,2*	245 ± 21,2	324,7 ± 25

Os valores de CIV₅₀ (µg/mL/poço) são expressos como média ± desvio padrão, obtidos dos experimentos de 48h de tratamento com fase vapor do timol. Os valores foram calculados por regressão não linear no *Software* GraphPad Prism 5.01. * representa diferença estatística entre as linhagens tumorais e a linhagem controle (MRC-5) obtidas pelo teste t ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

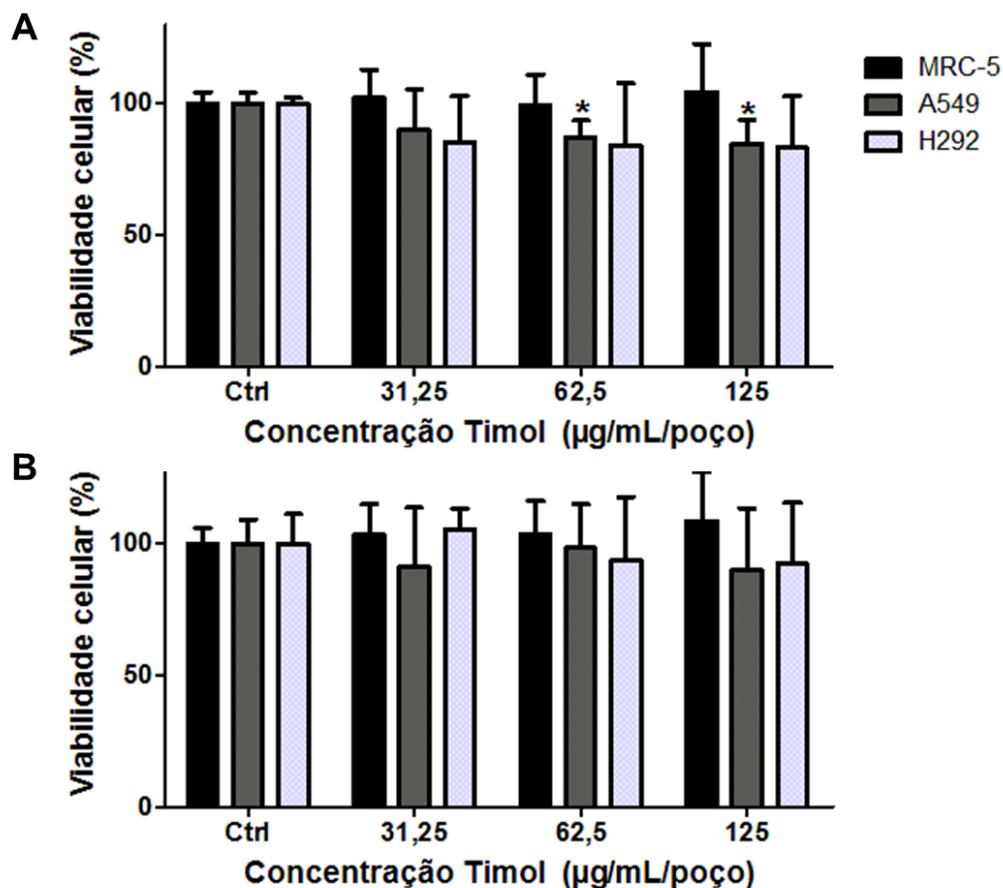
No trabalho de Jamali *et al.* (2018) a citotoxicidade do timol foi avaliada em células neoplásicas de mama e também em fibroblastos não-tumorais (linhagem L929), não havendo toxicidade significativa nas células não-tumorais.

Como já mencionado, algumas pesquisas evidenciam que o timol apresenta potencial antitumoral. No entanto, estes trabalhos avaliaram o efeito do timol solubilizado e diretamente em contato com as células, o que difere da presente pesquisa, na qual se avaliou o efeito da fase vapor do composto.

5.3 Avaliação do efeito da fase vapor do timol em células submetidas à radiação

Como descrito no item 4.4, foram realizados experimentos de citotoxicidade de 6 h de tratamento com o timol, sem exposição à radiação, com a finalidade de avaliar se o composto não causaria grande redução na viabilidade celular, por conseguinte, para que as células estivessem viáveis quando submetidas à irradiação. Os resultados estão expressos na Figura 13, onde é possível observar que houve redução significativa da viabilidade celular apenas na linhagem tumoral A549, com as concentrações de 62,5 e 125 µg/mL/poço. Portanto, optou-se pela realização de tratamentos de 6 h antes da exposição das células à radiação. Além disso, o tempo de 6 h foi considerado como adequado para garantir que o composto timol volatilize-se, se difunda e solubilize-se nos poços centrais onde estão as células (dados não mostrados).

Figura 13 - Efeito da fase vapor do timol sobre a viabilidade celular das linhagens MRC-5, A549 e H292.

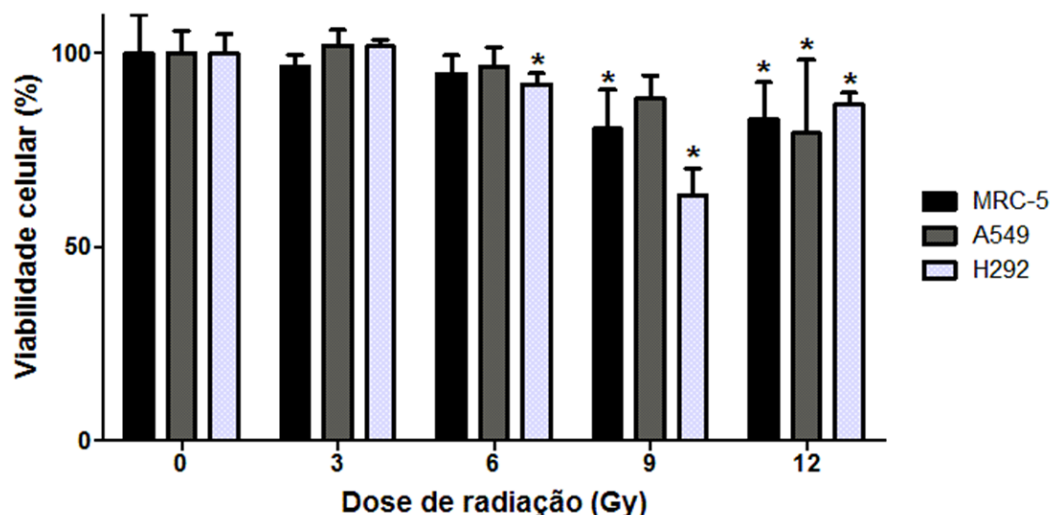


A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT (A) e coloração por SRB (B) após o período de 6h de tratamento com o vapor do timol. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. * representa diferença estatística em relação ao Ctrl (etanol P.A. + solução salina 0,9%), obtida por *One-Way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

Na figura 14 estão expressos os resultados das três linhagens expostas às diferentes doses de radiação. É possível observar que a dose que levou a maior redução da viabilidade das células MRC-5, H292 e A549 foi a de 9 Gy, com uma redução de cerca de 20, 36 e 12%, respectivamente. Desta forma, a dose de 9 Gy foi utilizada nos demais experimentos.

Figura 14 - Efeito de diferentes doses de radiação sobre a viabilidade celular das linhagens MRC-5, A549 e H292.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio do ensaio de redução de MTT passado o período de 24 h (A) após as células serem irradiadas. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. n=8 por ensaio. * representa diferença estatística em relação ao controle (0 radiação), obtida por *One-Way ANOVA* ($p < 0,05$).

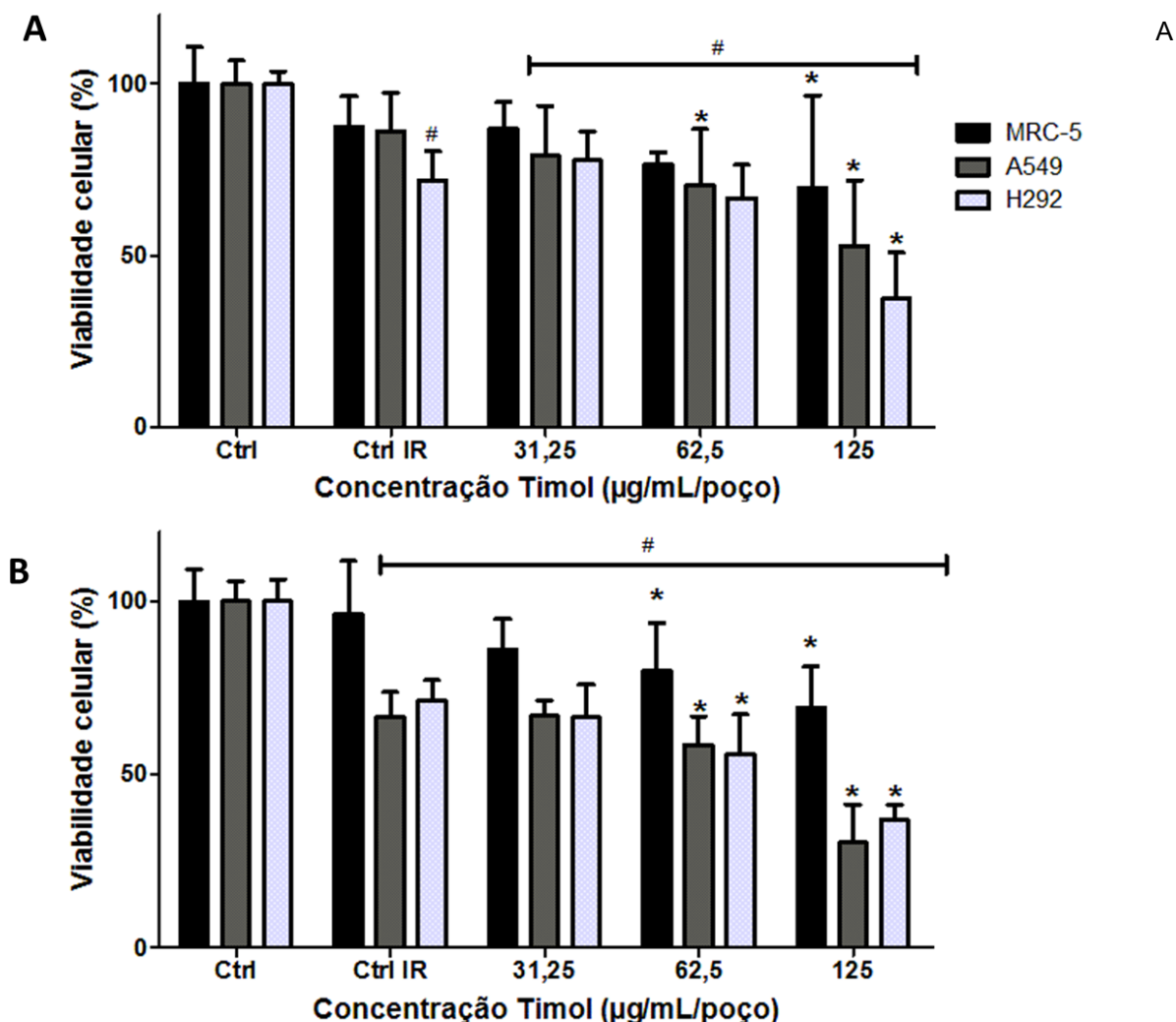
Fonte: A autora.

Quando determinada a viabilidade celular pelo ensaio de redução de MTT foi observado que o efeito associado da fase vapor do timol e radiação causou redução da viabilidade das células MRC-5 apenas com a concentração 125 µg/mL/poço quando comparado ao controle irradiado (Figura 15 A). Já quando a viabilidade celular foi analisada por meio da coloração com SRB houve redução da viabilidade celular a partir de 62,5 µg/mL/poço, no entanto, o controle irradiado não apresentou redução (Figura 15 B).

O efeito sinérgico da fase vapor do timol com a radiação é observado nas linhagens tumorais a partir da concentração de 62,5 µg/mL/poço considerando os valores de viabilidade celular obtidos no ensaio de SRB. Este efeito é mais evidente com a concentração de 125 µg/mL/poço, conforme observado na Figura 15.

Quando comparado o efeito da fase vapor do timol (125 µg/mL/poço) em associação à radiação nas três linhagens, as células tumorais apresentaram viabilidade celular cerca de duas vezes menor que as células não tumorais, sendo aproximadamente 30 % para a A549, 36 % para a H292 e 70 % para a MRC-5. Estes resultados são sugestivos de que existe seletividade, ou seja, as células tumorais estão mais suscetíveis aos efeitos citotóxicos do timol associado a radiação do que as células não tumorais MRC-5.

Figura 15 - Efeito da fase vapor do timol sobre a viabilidade celular nas linhagens MRC-5, A549 e H292 irradiadas com 9 Gy.



viabilidade celular (%) foi determinada pelo ensaio de redução do MTT (A) e pelo ensaio de coloração de proteínas com SRB (B) passado o período 48 h após as células serem irradiadas. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. # representa diferença estatística em relação ao controle (etanol P.A. + solução salina 0,9%) e * representa diferença estatística em relação ao Ctrl IR (etanol P.A. + solução salina 0,9% + 9 Gy de radiação) obtidas por *One-Way ANOVA* seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

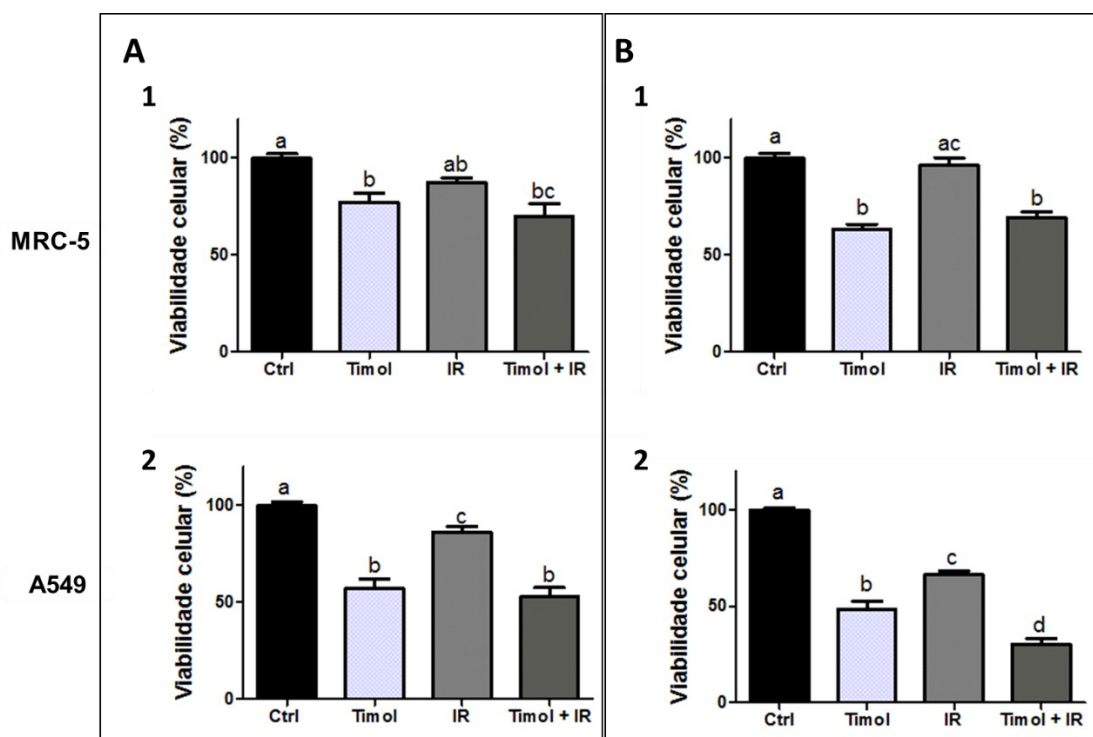
Conforme observado na Figura 15, o efeito da radiação difere conforme o método empregado para avaliar a viabilidade celular. Analisando os resultados da viabilidade celular determinada pelo ensaio de redução do MTT, observa-se um menor efeito da radiação quando comparado aos resultados de viabilidade celular determinados pelo ensaio de SRB, especialmente na linhagem tumoral A549, que apresentou redução da viabilidade celular em cerca de 15 % (MTT) e 33 % (SRB) quando foi irradiada com 9 Gy.

Essa diferença entre os resultados obtidos por meio do ensaio de redução de MTT e pelo ensaio de SRB poderia ser justificada pelo fato de que o primeiro método pode também refletir alterações que a radiação possa gerar nas células. De fato, já foi evidenciado que a radiação induz biogênese mitocondrial e ativação aumentada das mitocôndrias, levando a maior atividade das desidrogenases, que resulta em maior formação dos cristais de formazan e, portanto, apresenta estimativa falsa da quantidade de células viáveis (RAI *et al.*, 2018).

Por conseguinte, o aumento na atividade das mitocôndrias induzido pela radiação poderia explicar os maiores valores de viabilidade celular observados por meio do ensaio de redução do MTT. Desta forma, considera-se que os resultados obtidos por meio do ensaio de coloração com SRB representam uma estimativa mais adequada da quantidade de células viáveis.

É possível observar na Figura 16 a comparação entre o efeito *per se* do timol (125 µg/mL/poço) e em associação à radiação nas células MRC-5 e A549. Cabe ressaltar que, para esta comparação, foram realizados experimentos considerando o mesmo período de tratamento com o timol utilizado nos ensaios de associação à radiação, ou seja, 54 h pois o timol foi adicionado 6 h antes da exposição à radiação e foi deixado por mais 48 h. Não foi observado efeito sinérgico para a linhagem MRC-5, o qual foi evidente para a linhagem A549.

Figura 16 - Comparação entre o efeito da fase vapor do timol, da irradiação e da associação dos dois sobre a viabilidade das células MRC-5 e A549



A

viabilidade celular (%) foi determinada pelo ensaio de redução do MTT (A) e SRB (B). (1) Comparação entre o efeito da fase vapor do timol (125 µg/mL/poço), da irradiação e da associação dos dois sobre a viabilidade das células MRC-5 e (2) da A549. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de três ensaios independentes com n=4 por ensaio. Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos. As diferenças foram obtidas por *One-Way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora.

Desta maneira, a fase vapor do timol revelou-se um ótimo coadjuvante/radiossensibilizante quando empregada em associação à radiação, promovendo uma maior porcentagem de morte celular, superior ao seu valor *per se* e da radiação isolada.

Existem relatos de alguns compostos isolados de OEs que apresentaram potencial radiossensibilizante, atuando de maneira sinérgica com a radiação e, portanto, promovendo maior redução da viabilidade de células tumorais da mesma maneira como ocorreu com a fase vapor do timol na presente pesquisa. Contudo, cabe ressaltar mais uma vez que estas pesquisas avaliaram o efeito do composto diretamente sobre as células, o que difere deste trabalho, no qual foi avaliado o efeito da fase vapor.

Um monoterpene presente no OE de hortelã e frutas cítricas, o álcool perílico, foi capaz de causar maior redução da viabilidade de células do câncer de próstata

(linhagens DU145 e PC3) quando feito um pré-tratamento de 72 horas antes da exposição à radiação (RAJESH; HOWARD, 2003). Outro monoterpeno, a timoquinona, presente no OE de *Nigella sativa* L., resultou em aumento significativo da citotoxicidade induzida por radiação em células de carcinoma de mama humano (linhagens MCF-7 e T47D) (VELHO-PEREIRA *et al.*, 2011).

Cabe ressaltar que o timol é capaz de induzir a geração de EROs e o estresse oxidativo mitocondrial aumentado pode promover uma sensibilização das células tumorais à radiação (TANG *et al.*, 2018). Chauhan *et al.* (2017) verificaram que o composto causa um estresse oxidativo em células de carcinoma colo retal (linhagem HCT-116) induzindo-as à morte por apoptose. Tal mecanismo também foi relatado em células de câncer de bexiga (linhagens T24, SW780 e J82) (LI *et al.*, 2017b) e foi amplamente discutido na revisão de Islam *et al.* (2019).

Na pesquisa de Jamali *et al.* (2018), o timol induziu à apoptose em células de câncer de mama (MDA-MB231) por meio da despolarização da membrana mitocondrial mediada por EROs, fragmentação do DNA e atividade de caspases. Além disso, os autores verificaram que o timol é capaz de se ligar ao DNA, causando interrupção no ciclo celular e levando a apoptose.

Vale lembrar que a radiação, por meio dos efeitos indiretos, também provoca danos celulares por meio de radicais livres e EROs produzidas pela radiólise da água (REISZ *et al.*, 2014). Sendo assim, as EROs geradas por conta da radiação podem ser somadas às EROs provenientes do mecanismo de ação do timol e, portanto, causar mais danos às células, provocando maior redução na viabilidade celular. No entanto, seriam necessários mais estudos para evidenciar o mecanismo de ação pelo qual a fase vapor do timol *per se* e em associação à radiação, induz as células tumorais a morte.

6 CONCLUSÕES

Por meio da análise cromatográfica foram identificados como compostos majoritários do OE de tomilho, adquirido comercialmente da Ferquima, o timol e o *p*-cimeno, perfazendo 41,84% e 32,67%, respectivamente. Cabe ressaltar que tal composição está de acordo com a composição do OE de tomilho descrita na literatura.

A fase vapor do OE de tomilho foi citotóxica de maneira dose dependente tanto para as linhagens tumorais (A549 e H292) como para a linhagem não tumoral de pulmão, o modelo de fibroblastos MRC-5 e, portanto, não houve seletividade. A fase vapor do timol também foi citotóxica para todas as linhagens, todavia, apresentou-se menos tóxica para a linhagem não tumoral (MRC-5), com índice de seletividade superior a 2 para o período de 48 h de tratamento.

A fase vapor do timol revelou-se um ótimo coadjuvante quando empregada em associação a radiação, promovendo uma maior porcentagem de morte celular, superior ao seu valor *per se*, bem como da radiação isolada. Portanto, a fase vapor do timol poderia ser classificada como radiosensibilizante.

REFERÊNCIAS

- ABEDI, S. M. et al. Radioprotective effect of thymol against salivary glands dysfunction induced by ionizing radiation in rats. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 861–866, 2016.
- AL-MENHALI, A. et al. *Thymus vulgaris* (Thyme) Inhibits Proliferation, Adhesion, Migration, and Invasion of Human Colorectal Cancer Cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 1, p. 54–59, 2014.
- ANDRADE, M. A. et al. Anticancer Properties of Essential Oils: An Overview. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 10, p. 957–966, 2018.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira. 6ª Ed.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/Plantas+medicinais+Pronto.pdf/1b7220eb-a371-4ad4-932c-365732a9c1b8>>. Acesso em: 28 fev. 2020.
- ARCHANA, P. R. et al. Thymol, a naturally occurring monocyclic dietary phenolic compound protects Chinese hamster lung fibroblasts from radiation-induced cytotoxicity. **Mutation Research**, v. 680, p. 70–77, 2009.
- ARCHANA, P. R.; NAGESHWAR RAO, B.; SATISH RAO, S. S. In vivo radioprotective potential of thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 2, p. 136–145, 2011.
- ARIVALAGAN, S. et al. Radioprotective Effect of Carvacrol Against X-Radiation-Induced Cellular Damage in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 34, n. 3, p. 263–275, 2015.
- AYESH, B. M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. In vitro inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 612, p. 1–6, 2014.
- AZIZ, Z. A. A. et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 19, n. 13, p. 1100–1110, 2018.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BAYALA, B. et al. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. **American journal of cancer research**, v. 4, n. 6, p. 591–607, 2014.
- BRASIL. **Portaria nº 957, de 26 de Setembro de 2014. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Pulmão.** Disponível em: <<https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/29/Portaria-SAS-DDT-Pulmao-23-09-2014.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

BURDETT, S. Chemotherapy for non-small cell lung cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, p. 1–13, 2015.

CHAUHAN, A. K. et al. Thymol Elicits HCT-116 Colorectal Carcinoma Cell Death Through Induction of Oxidative Stress. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 1942–1950, 2017.

CHEN, Z. et al. Non-small-cell lung cancers: A heterogeneous set of diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 8, p. 535–546, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DEB, D. D. et al. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, p. 97–106, 2011.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308–323, 2007.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FISCHER, N.; SEO, E.; THOMAS, E. Prevention from radiation damage by natural products. **Phytomedicine**, v. 47, p. 192–200, 2018.

FOGANG, H. P. D. et al. In vitro biological activities of seed essential oils from the *Cameroonian* spices *Afrostryax lepidophyllus* MILDBR. and *Scorodophloeus zenkeri* harms rich in sulfur-containing compounds. **Chemistry and Biodiversity**, v. 11, n. 1, p. 161–169, 2014.

GALETTI, M. et al. Effect of ABCG2/BCRP expression on efflux and uptake of Gefitinib in NSCLC cell lines. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–18, 2015.

GAUTAM, N. et al. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014, p. e154106, 2014.

GLOBOCAN. **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018**. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf?ua=1>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

GLOBOCAN. **Population Fact Sheets - Brazil**. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>>.

Acesso em: 28 jan. 2019.

GREENWELL, M.; RAHMAN, P. K. S. M. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. **Int J Pharm Sci Res.**, v. 6, n. 10, p. 4103–4112, 2015.

GRIDELLI, C. et al. Non-small-cell lung cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, 2015.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 20, p. 1593–1603, 2002.

HAN, S. Y. et al. *Marsdenia tenacissima* extract restored gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cells. **Lung Cancer**, v. 75, n. 1, p. 30–37, 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HEPPNER, G. H.; MILLER, B. E. Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. **Cancer and Metastasis Review**, v. 2, n. 1, p. 5–23, 1983.

HOSSEINIMEHR, S. J. Trends in the development of radioprotective agents. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 19–20, p. 794–805, 2007.

HSIEH, C. C. et al. Surgical outcomes of pulmonary mucoepidermoid carcinoma: A review of 41 cases. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–12, 2017.

HUDAIB, M. et al. CG/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p. 691–700, 2002.

INCA. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, p. 130, 2017.

INCA. **Câncer de pulmão**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

INCA. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, p. 122, 2019.

ISLAM, M. T. et al. Anticancer activity of thymol: A literature-based review and docking study with emphasis on its anticancer mechanisms. **IUBMB Life**, v. 71, n. 1, p. 9–19, 2019.

JAMALI, T. et al. In-vitro evaluation of apoptotic effect of OEO and thymol in 2D and 3D cell cultures and the study of their interaction mode with DNA. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–19, 2018.

JEENA, K. et al. Protection against whole body γ -irradiation induced oxidative stress and clastogenic damage in mice by ginger essential oil. **Asian Pacific Journal of**

Cancer Prevention, v. 17, n. 3, p. 1325–1332, 2016.

KANG, S. et al. Anticancer Effect of Thymol on AGS Human Gastric Carcinoma Cells. **J. Microbial. Biotechnol.**, v. 26, n. 1, p. 28–37, 2016.

KOPARAL, A. T.; ZEYTINOGLU, M. Effects of Carvacrol on a Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line, A549. **Cytotechnology**, v. 43, n. 1–3, p. 149–154, 2003.

KUBATKA, P. et al. Anticancer activities of *Thymus vulgaris* L. In experimental breast carcinoma *in vivo* and *in vitro*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1–29, 2019.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins, Patologia Básica**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LANGHASOVA, L. et al. Essential oil from *Myrica rubra* leaves inhibits cancer cell proliferation and induces apoptosis in several human intestinal lines. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 20–26, 2014.

LI, A. et al. Hypermethylation of ATP-binding cassette B1 (ABCB1) multidrug resistance 1 (MDR1) is associated with cisplatin resistance in the A549 lung adenocarcinoma cell line. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 6, p. 412–421, 2017a.

LI, G. et al. Down-regulation of survivin and hypoxia-inducible factor-1 α by β -elemene enhances the radiosensitivity of lung adenocarcinoma xenograft. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 27, n. 1, p. 56–64, 2012.

LI, L. J. et al. β -Elemene radiosensitizes lung cancer A549 cells by enhancing DNA damage and inhibiting DNA repair. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 7, p. 1095–1097, 2011.

LI, Y. et al. Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 491, n. 2, p. 530–536, 2017b.

MAHRAN, Y. F. et al. Carvacrol and Thymol Modulate the Cross-Talk between TNF- α and IGF-1 Signaling in Radiotherapy-Induced Ovarian Failure. **Oxidative medicine and cellular longevity**, p. 1–10, 2019.

MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: A looking glass for cancer? **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 5, p. 323–334, 2012.

MOLINA, J. R. et al. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 5, p. 584–594, 2008.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65,

p. 55–63, 1983.

NCI. **Lung Cancer Prevention**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/lung-prevention-pdq#link/_166_toc>. Acesso em: 30 jan. 2019.

NEBBIOSO, A. et al. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 6, p. 1–25, 2018.

NIKOLIC, M. et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops & Products**, v. 52, p. 183–190, 2014.

NOVAES, F. T. et al. Lung cancer: histology, staging, treatment and survival. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 34, n. 8, p. 595–600, 2008.

OMS. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 10 maio. 2018.

OZKAN, A.; ERDOGAN, A. A Comparative Study of the Antioxidant/Prooxidant Effects of Carvacrol and Thymol at Various Concentrations on Membrane and DNA of Parental and Drug Resistant H1299 Cells. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 12, p. 1557–1560, 2012.

PATTERSON, A. D. et al. Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 277–283, 2018.

PIRBALOUTI, A. G.; HASHEMI, M.; GHAFAROKHI, F. T. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops & Products**, v. 48, p. 43–48, 2013.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (thyme) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). **Journal of Serbian Chemical Society**, v. 73, n. 3, p. 307–310, 2008.

RAI, Y. et al. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

RAJESH, D.; HOWARD, S. P. Perillyl alcohol mediated radiosensitization via augmentation of the Fas pathway in prostate cancer cells. **Prostate**, v. 57, n. 1, p. 14–23, 2003.

REISZ, J. A. et al. Effects of ionizing radiation on biological molecules - mechanisms of damage and emerging methods of detection. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 21, n. 2, p. 260–292, 2014.

RUSSO, R. et al. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in

cancer therapy. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

SAMAILA, D. et al. Monoterpenes enhanced the sensitivity of head and neck cancer cells to radiation treatment in vitro. **Anticancer Research**, v. 24, p. 3089–3095, 2004.

SAMARTH, R. M.; SAMARTH, M.; MATSUMOTO, Y. Medicinally important aromatic plants with radioprotective activity. **Future Sci. OA**, v. 3, n. 4, p. FSO247, 2017.

SANTINI, D. et al. Natural History of Non-Small-Cell Lung Cancer with Bone Metastases. **Scientific Reports**, v. 5, n. November, p. 1–9, 2015.

SATOOKA, H.; KUBO, I. Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2746–2752, 2012.

SEAL, S. et al. Vapor of Volatile Oils from *Litsea cubeba* Seed Induces Apoptosis and Causes Cell Cycle Arrest in Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

SERTEL, S. et al. Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 31, n. 1, p. 81–87, 2011.

SHABNUM, S.; WAGAY, M. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. **J Res Develop**, v. 11, p. 83–94, 2011.

SOKOVIĆ, M. D. et al. Chemical Composition of *Thymus* and *Mentha* Species and their Antifungal Activities. **Molecules**, v. 14, p. 238–249, 2009.

STAHL-BISKUP, E. The Chemical Composition of *Thymus* Oils: A Review of the Literature 1960 – 1989. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, p. 61–82, 1991.

TANG, L. et al. Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 87, p. 1–15, 2018.

VELHO-PEREIRA, R. et al. Radiosensitization in human breast carcinoma cells by thymoquinone: role of cell cycle and apoptosis. **Cell Biology International**, v. 35, n. 10, p. 1025–1029, 2011.

VILLANUEVA, N.; BAZHENOVA, L. New strategies in immunotherapy for lung cancer: beyond PD-1/PD-L1. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, v. 12, p. 1–29, 2018.

WAJED, S. A.; LAIRD, P. W.; DEMEESTER, T. R. DNA methylation: An alternative pathway to cancer. **Annals of Surgery**, v. 234, n. 1, p. 10–20, 2001.

XI, J. JIE et al. Primary pulmonary mucoepidermoid carcinoma: An analysis of 21 cases. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2012.

ZHENG, M. Classification and Pathology of Lung Cancer. **Surgical Oncology Clinics**

of North America, v. 25, n. 3, p. 447–468, 2016.

ZU, Y. et al. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3200–3210, 2010.