

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BARBARA JUSTUS

MORFOANATOMIA FOLIAR E CAULINAR, ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO ÓLEO VOLÁTIL DE *Lavandula dentata* L., LAMIACEAE

PONTA GROSSA
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BARBARA JUSTUS

MORFOANATOMIA FOLIAR E CAULINAR, ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO ÓLEO VOLÁTIL DE *Lavandula dentata* L., LAMIACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

Coorientadora: Prof. Dra. Jane Manfron Budel

PONTA GROSSA
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Justus, Barbara
J96 Morfoanatomia foliar e caulinar,
análise química e atividades biológicas do
óleo volátil de Lavandula dentata L.,
Lamiaceae/ Barbara Justus. Ponta Grossa,
2016.
95f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.

Coorientadora: Profª Drª Jane Manfron
Budel.

1.1-8 cineol. 2.Antimicrobiano.
3.Antioxidante. 4.Citotoxicidade.
5.Morfoanatomia. I.Farago, Paulo Vitor.
II. Budel, Jane Manfron. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.321

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 06/2016, DA MESTRANDA BARBARA JUSTUS REALIZADO NO DIA 24 DE FEVEREIRO DE 2016, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e quatro dias de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 14h00min na sala 115, bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Professora Doutora Jane Manfron Budel (UEPG) reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Barbara Justus na linha de pesquisa: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácia/Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos, constituídos pelos demais Doutores (membros titulares): Carla Cristine Kanunfre (UEPG) e João Carlos Palazzo de Mello (UEM). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: "Morfoanatomia Foliar e Caulinar, Análise Química e Atividade Biológicas do Óleo Volátil de *Lavanda dentata* L., Lamiaceae". Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se aprovada a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em - Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 60 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. 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: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Jane Manfron Budel 1- Presidente (DEFAR – UEPG)

Carla Cristine Kanunfre 2- (DEBIO/UEPG) – Titular

João Carlos de Mello 3- (UEM) – Titular

Ponta Grossa, 24 de Fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que nunca me deixou só. Sempre estive ao meu lado quando os dias se tornavam difíceis e sempre iluminava o caminho por onde eu iria passar.

Aos meus familiares, que desde sempre foram meu alicerce. Sempre me dando forças para continuar, minha fonte de vida!

Ao professor Dr. Paulo Vitor Farago, que me acompanha desde a graduação até hoje, me dando oportunidades incríveis! Tenho orgulho em dizer que desde sempre você foi meu orientador.

À professora Dra. Jane Manfron Budel, por ter me ajudado e me apoiado em todos os momentos em que precisei. Pela sua atenção, cuidado e disposição para me auxiliar com as atividades do meu trabalho.

À professora Dra. Carla Cristine Kanunfre, que me deu apoio em todos os dias de trabalho. Mais do que minha professora, quero poder contar com todos os ensinamentos que você tem para me dar para a vida.

À professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia da Universidade Federal do Paraná que colaborou com as análises químicas do óleo volátil.

À professora Msc. Mariane Ferreira de Faria pela ajuda com as análises de citometria.

À professora Dra. Katia Sabrina Paludo por ter cedido as células para a realização dos ensaios citotóxicos. Muito obrigada!

À professora Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula, que sempre está do meu lado e me apoia nos momentos em que mais preciso.

Ao graduando Valter Paes de Almeida que auxiliou na pesquisa morfoanatômica.

RESUMO

Lavandula dentata L. é um pequeno arbusto nativo do Mediterrâneo. É conhecida popularmente como lavanda e alfazema e é utilizada na medicina popular como antidiabético, anti-hipertensivo e antiprotozoário. O objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo da morfoanatomia foliar e caulinar, bem como determinar a composição química, avaliar a atividade antioxidante, o efeito antimicrobiano e o potencial citotóxico do óleo volátil de *L. dentata*. As partes vegetativas aéreas foram coletadas no Horto Medicinal do Curso de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Paraná). A partir dos métodos usuais de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura, foram evidenciados estômatos diacíticos apenas na face abaxial do limbo foliar, tricomas tectores ramificados e glandulares capitados e peltados, mesofilo dorsiventral e nervura central côncava-convexa truncada na face abaxial. Além disso, um caule com formato quadrangular, sistema vascular típico e calotas esclerenquimáticas bem desenvolvidas nas quatro arestas. A partir das folhas e caules, por hidrodestilação, obteve-se um teor de 0,85% de óleo volátil. O principal componente do óleo volátil identificado por CG/MS foi o 1-8 cineol. Pelo método fosfomolibdênico, o óleo volátil de *L. dentata* revelou uma capacidade antioxidante semelhante à rutina e ao ácido gálico. Entretanto, pelo método do radical livre DPPH e do ABTS, foi observado um leve potencial antioxidante. O óleo volátil de *L. dentata* apresentou um efeito antimicrobiano frente às cepas de bactérias gram-positivas, gram-negativas e de *Candida albicans*, por meio da microdiluição em caldo. Neste trabalho foi evidenciado o efeito citotóxico tanto da fase líquida quanto da fase vapor do óleo volátil de *L. dentata* sobre a linhagem tumoral pulmonar Calu-3. O IC50 calculado para fase líquida do óleo volátil de *L. dentata* foi de 388,84 µg.mL⁻¹. A fração da fase vapor do óleo na concentração de 750 µg.mL⁻¹ reduziu a viabilidade celular da linhagem Calu-3 significativamente, efeito que foi corroborado por três diferentes técnicas, redução do MTT, SRB e DNA-PI. Os resultados das avaliações morfológicas empregando os corantes de Rosenfeld, alaranjado de acridina/brometo de etídio e Hoescht, bem como pelo ensaio de liberação de lactato desidrogenase são sugestivos de que a citotoxicidade da fase de vapor óleo está relacionada a indução de morte celular por necrose, o que foi confirmado pelo fato do vapor do óleo não gerar externalização de fosfatidilserina. Todavia, devido a relatos na literatura de que as células Calu-3 expressam a proteína glicoproteína-P, a qual confere em tumores resistência a fármacos e bloqueio da apoptose, não se pode excluir a indução de morte celular por esse mecanismo também. O vapor do óleo de lavanda promoveu parada do ciclo celular em G0/G1 quando o conteúdo de DNA foi avaliado por citometria de fluxo. Considerando esses resultados, estudos adicionais podem ser recomendados, visando à utilização do óleo volátil de *L. dentata* como matéria-prima pela indústria farmacêutica, com especial destaque para o emprego da fase vapor do óleo volátil na terapia de tratamento de câncer de pulmão por via inalatória.

Palavras-chave: 1-8 cineol, antimicrobiano, antioxidante, citotoxicidade, morfoanatomia.

ABSTRACT

Lavandula dentata L. presents as a small shrub, is native of the Mediterranean, with great pharmacological potential. The objective of this paper was study the morphoanatomy of the leaf, determine its chemical composition, antioxidant activity, antimicrobial activity and evaluate the cytotoxic potential of the volatile oil of *L. dentata*. Botanical material was collected in the Medicinal Garden of Pharmacy course at the State University of Ponta Grossa (Paraná). Diacytic stomata images obtained by optical microscopy and scanning electron microscopy, were evidenced only on the abaxial surface of the leaf blade, non-glandular branched trichomes, glandular capitate and peltate, dorsiventral mesophyll and concave-convex truncated midrib on the abaxial surface. The yield of volatile oil obtained by hydrodestilation of the aerial parts was 0.85%, and showed 1-8 cineole as main component identified by GC/MS. Volatile oil of *L. dentata* showed an antioxidant activity similar to rutin and gallic acid when analyzed by phosphomolibdenum method. However, by the free radical DPPH and ABTS method, it showed a slight potential antioxidant. The volatile oil showed antimicrobial activity against gram-positive, gram-negative bacteria strains and *Candida albicans*, by broth microdilution. This study, for the first time, shows the cytotoxic effect of the vapor phase of the volatile oil from *L. dentata* on lung tumor cell line Calu-3. The IC₅₀ calculated for liquid phase of volatile oil was 388.84 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The fraction of oil vapor in a concentration of 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduced the cell viability of Calu-3 significantly, based on three different techniques, the MTT reduction assays, SRB and DNA-PI. The results of morphological evaluations by Rosenfeld dyes, acridine orange/ethidium bromide and Hoescht, as well as the lactate dehydrogenase release assay gave an indication that the oil is cytotoxic to induce the cells death by necrosis, which was confirmed by the fact that the oil does not generate phosphatidylserine externalization. However, due to reports in literature, the expression of P-glycoprotein, which confers drug resistance in tumors and block apoptosis, in Calu-3 cells can not confirm the absence of this mechanism as well. The oil vapor promoted cell cycle arrest in G₀/G₁ when the DNA content was evaluated by flow cytometry. Considering these results, additional studies may be recommended, in order to use the volatile oil *L. dentata* as material for the pharmaceutical industry, with particular emphasis on the use of oil vapor in the lung cancer treatment therapy via inhalation.

Key words: 1-8 cineole, antimicrobial, antioxidant, citotoxicity, morphoanatomy.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Aspecto geral de *Lavandula dentata*.
- FIGURA 2. Relação entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o câncer e o programa carcioantioxidante.
- FIGURA 3. O modelo dos três estágios da carcinogênese.
- FIGURA 4. Aspecto geral das células Calu-3 (ATCC HTB-55) em baixa e alta densidade.
- FIGURA 5. Aspecto geral das células Calu-3 em microscopia confocal.
- FIGURA 6. Modelo ilustrativo do plaqueamento das células Calu-3 para determinação da citotoxicidade e para a busca do mecanismo de ação da fase vapor do óleo volátil.
- FIGURA 7. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae – Aspectos gerais.
- FIGURA 8. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae. – Vista frontal da face abaxial (MEV).
- FIGURA 9. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae. – Vista frontal da face adaxial (MEV).
- FIGURA 10. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae – folha.
- FIGURA 11. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae – nervura central.
- FIGURA 12. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae – caule.
- FIGURA 13. Média da atividade antioxidante relativa (%AAR) do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico.
- FIGURA 14. Efeito da fase líquida do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. em diferentes concentrações sobre células Calu-3.
- FIGURA 15. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. em diferentes concentrações sobre células Calu-3.
- FIGURA 16. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre as células Calu-3 em diferentes períodos de tratamento.
- FIGURA 17. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina com brometo de egídio (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 100X).
- FIGURA 18. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina com brometo de etídio (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 200X).

FIGURA 19. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina com brometo de etídio (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 400X).

FIGURA 20. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina com brometo de etídio e Hoescht 33342 (Microscopia óptica de fluorescência – aumento de 200x).

FIGURA 21. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) citoplasmática das células Calu-3.

FIGURA 22. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre o ciclo celular das células Calu-3.

FIGURA 23. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a despolarização de mitocôndria das células Calu-3.

FIGURA 24. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a externalização da fosfatidilserina das células Calu-3.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição química do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. obtida por CG-MS.

TABELA 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. após 24 horas de tratamento.

TABELA 3. Porcentagem de capacidade antioxidante pelo método do DPPH• em diferentes concentrações no tempo 30 minutos.

TABELA 4. Porcentagem de capacidade antioxidante de diferentes concentrações do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. pelo método de descoloração do radical catiônico ABTS•⁺.

TABELA 5. Distribuição porcentual das células Calu-3 nas fases do ciclo celular após tratamento com a fase vapor do óleo.

TABELA 6. Porcentagem de polarização mitocondrial das células Calu-3 após tratamento com a fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L.

TABELA 7. Porcentagem de células Calu-3 que apresentaram externalização da fosfatidilserina após tratamento com a fase vapor do óleo de *Lavandula dentata* L.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. FAMÍLIA LAMIACEAE	14
2.2. GÊNERO <i>Lavandula</i> L.	14
2.3. <i>Lavandula dentata</i> L.	15
2.4. ÓLEOS VOLÁTEIS	16
2.5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS VOLÁTEIS	18
2.5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	18
2.5.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	19
2.5.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA	20
2.6. CÉLULAS CALU-3	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. OBJETIVO GERAL	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. MATERIAL BOTÂNICO	26
4.2. ESTUDO MORFOANATÔMICO	26
4.2.1. LÂMINAS SEMIPERMANENTES	26
4.2.2. TESTES MICROQUÍMICOS	26
4.2.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	27
4.2. EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO VOLÁTIL DE <i>Lavandula dentata</i> L.	27
4.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO VOLÁTIL DE <i>Lavandula dentata</i> L.	27
4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	28
4.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	29
4.5.1. MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	30
4.5.2. MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO	30
4.5.3. MÉTODO DE DESCOLORAÇÃO DO RADICAL ABTS• ⁺ (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico])	31
4.6. LINHAGEM CELULAR, CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ÓLEO VOLÁTIL EM CÉLULAS CALU-3	32
4.6.1. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	33
4.6.2. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E BUSCA PELO MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL EM CÉLULAS CALU-3	35
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA	41

5.2.	ANÁLISE DO ÓLEO VOLÁTIL POR CG-EM.....	52
5.3.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	54
5.3.1.	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	54
5.4.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	55
5.4.1.	MÉTODO DA REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH•.....	55
5.4.2.	MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO.....	56
5.4.3.	MÉTODO DE DESCOLORAÇÃO DO RADICAL ABTS• ⁺	57
5.5.	AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO ÓLEO VOLÁTIL SOBRE CÉLULAS CALU-3.....	58
5.6.	CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E BUSCA PELO MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL EM CÉLULAS CALU-3.....	63
5.6.1.	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA CELULAR POR MEIO DO EMPREGO DOS CORANTES: ROSENFELD (1947), ALARANJADO DE ACRIDINA COM BROMETO DE ETÍDIO (AO/BE) E HOESCHT 33342	63
5.6.2.	ENSAIO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA PELA LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH).....	68
5.6.3.	ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	69
5.6.4.	ANÁLISE DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO DE MITOCÔNDRIA.....	70
5.6.5.	ENSAIO DE EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA - ANEXINA V	71
6.	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

O ecossistema brasileiro fornece material para o estudo de novos fármacos devido a sua grande diversidade com alto potencial terapêutico. Por diversas civilizações, o uso de plantas medicinais sobreviveu a evolução tecnológica e atualmente é alvo de inúmeras pesquisas científicas para o tratamento de diferentes patologias (VANDERLINDE *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2011). A vincristina e a vimblastina são exemplos de antineoplásicos isolados da espécie vegetal *Catharanthus roseus* (L.) G. Don amplamente utilizados na medicina (RUFATTO *et al.*, 2013). Estes compostos podem ser provenientes ou análogos de compostos derivados de plantas (APONTE *et al.*, 2011) ou também podem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de novas substâncias (RUFATTO *et al.*, 2013).

Comumente no tratamento do câncer existe uma barreira que o torna extremamente complicado: a resistência a múltiplos fármacos, ou seja, as células cancerígenas perdem a sensibilidade aos agentes quimioterápicos estruturalmente diferentes. Neste sentido, a busca por substâncias naturais que sensibilizem as células para a ação dos medicamentos é uma área bem explorada da ciência (GAUTAM *et al.*, 2014; BERDOWSKA *et al.*, 2013).

Lavandula L. se enquadra nos perfis de grande potencial farmacológico pertencente à flora brasileira, visto alguns resultados de trabalhos que avaliaram tanto a atividade citotóxica, como observado em *Lavandula angustifolia* Mill. e *Lavandula stoechas* L. (GAUTAM *et al.*, 2014), quanto às atividades antimicrobiana e antioxidante (SARIRI *et al.*, 2009). Estas atividades estão relacionadas a presença de diversos constituintes químicos dos óleos voláteis já obtidos, como acetato de linalol, fenchona, linalol, α -terpineol, 1,8-cineol e a cânfora. Estes dois últimos conferem ação antiespasmódica, antifúngica, bactericida, anti-inflamatória, analgésica, repelente e inseticida ao óleo (TOUATI *et al.*, 2011; IMELOUANE *et al.*, 2009; UPSON, 2000).

Lavandula dentata L., é conhecida popularmente como alfazema e é uma espécie medicinal utilizada na medicina tradicional como antidiabético, contra resfriado comum, para cólica renal, como antiespasmódico, anti-hipertensivo e anti protozoário. Também é utilizado na ornamentação e como planta melífera (DUARTE

& SOUZA, 2014; MACHADO *et al.*, 2011; BONA *et al.*, 2010; IMELOUANE *et al.*, 2009; BOUSMAHA *et al.*, 2006; UPSON, 2000).

Um problema grave no comércio brasileiro de plantas medicinais e drogas vegetais é a adulteração e a falsificação (ARAÚJO *et al.*, 2015; WOSCH *et al.*, 2015) e no caso de espécies de *Lavandula*, agrava-se, uma vez que apresentam grande capacidade de hibridização e diversidade morfológica o que dificulta a identificação das espécies (MASETTO *et al.*, 2011). Outro problema importante é o nome popular, pois várias espécies são conhecidas pela mesma denominação popular de lavanda ou alfazema e utilizadas para a mesma finalidade terapêutica (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; RIVA, 2012). Adicionalmente, verifica-se que a publicação de monografias farmacopeicas não acompanha a necessidade do mercado consumidor (KATO *et al.*, 2012).

Considerando o potencial terapêutico de *L. dentata*, o presente trabalho tem o objetivo de analisar morfoanatomicamente as partes vegetativas aéreas, fornecendo subsídios farmacobotânicos para a identificação da espécie medicinal; realizar ensaios químicos, microbiológicos, antioxidantes e citotóxicos do óleo volátil com a finalidade de caracterização desse óleo, contribuindo para desenvolvimento de fitoterápicos, de derivados, análogos ou protótipos de novas substâncias para a terapia do câncer.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FAMÍLIA LAMIACEAE

Lamiaceae, a maior família de Angiospermas, possui 22.576 espécies e 245 gêneros com importantes propriedades medicinais (THE PLANT LIST, 2015; BRÄUCHLER *et al.*, 2010). Alguns gêneros pertencentes, como *Lavandula*, são cultivados devido as qualidades aromáticas. Espécies desta família são ricas em compostos fenólicos como ácido rosmarínico, ácido p-cumarínico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, luteolina, apigenina, genkwanina, quercetina, rutina, epicatequina e catequina, que conferem propriedades biológicas como antimicrobiano, antifúngico, anti-inflamatório, anticâncer (LEE *et al.*, 2011).

2.2. GÊNERO *Lavandula* L.

Lavandula L. compreende 39 espécies originárias da região do Mediterrâneo, ilhas do Atlântico, Península Arábica, Índia e Ilhas Canárias. Espécies desse gênero são aromáticas, sendo utilizadas na medicina tradicional e como ornamentais. São conhecidas popularmente no Brasil como alfazemas e lavandas (DUARTE & SOUZA, 2014; GONÇALVES & ROMANO, 2013; MASETTO *et al.*, 2011; BONA *et al.*, 2010; UPSON *et al.*, 2000; SUAREZ-CERVERA & SEOANE-CAMBA, 1987). A utilização destas espécies se iniciou com os antigos Gregos e Romanos, porém nos últimos anos ocorreu um maior interesse pelas lavandas e suas aplicações (GONÇALVES & ROMANO, 2013). Dentre as espécies deste gênero, destacam-se: *Lavandula dentata* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Lavandula latifolia* Medik., *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel., *Lavandula stoechas* L., *Lavandula dhofarensis* A. G. Mill. (HANAMANTHAGOUNDA *et al.*, 2010), todavia apenas algumas são bem conhecidas, a exemplo de *L. angustifolia*, *L. latifolia* e *L. stoechas* (UPSON *et al.*, 2000). A identificação e a diferenciação de espécies de *Lavandula* é complexa, uma vez que apresentam grande capacidade de hibridização e diversidade morfológica (MASETTO *et al.*, 2011).

Lavandula se destaca pela ampla aplicação em âmbito comunitário, seja na aromaterapia em massagens ou para reduzir a ansiedade, na indústria como

essência, perfume, flavorizante, produtos terapêuticos e componentes voláteis (DUARTE & SOUZA, 2014; GONÇALVES & ROMANO, 2013; MASETTO *et al.*, 2011; BONA *et al.*, 2010; IMELOUANE *et al.*, 2009; SANZ *et al.*, 2004).

Considerando a riqueza de compostos bioativos, as espécies desta família são utilizadas popularmente como antidiabético, anti-hipertensivo, carminativo, colagogo, espasmolítico, sedativo, antiviral, antisséptico, como agente antiprotzoários, como antioxidante, antimicrobiano, inseticida, parasiticida, herbicida, anti-inflamatório, antialérgico, antiviral e como preventivo do câncer (ZUZARTE *et al.*, 2012; BLAZEKOVIĆ *et al.*, 2011; NITZSCHE *et al.*, 2004). Adicionalmente, o óleo de *Lavandula* spp. vem sendo testado para reduzir a demência (GONÇALVES & ROMANO, 2013).

O óleo de *Lavandula* spp. pode apresentar uma variabilidade fitoquímica devido a fatores como, temperatura, quantidade de água e nutrientes no solo, latitude, altitude, época da coleta, suscetibilidade a patógenos, idade da planta e órgão de armazenamento (GONÇALVES & ROMANO, 2013; MASETTO *et al.*, 2011; IMELOUANE *et al.*, 2009; UPSON *et al.*, 2000). Esta variação, apresentada principalmente por *L. dentata*, parece ser vantajosa, uma vez que pode ser fonte de diversas substâncias ativas com variáveis atividades biológicas (SORO *et al.*, 2014).

Os óleos voláteis de representantes de *Lavandula* provém dos tricomas glandulares encontrados na superfície de caules, folhas e flores. Esses tricomas são classificados micromorfologicamente como peltados e capitados e encerram os óleos voláteis no espaço subcuticular (DUARTE & SOUZA, 2014; LIU *et al.*, 2012; CELEP *et al.*, 2011). Seus componentes majoritários são os monoterpenos (GONÇALVES & ROMANO, 2013; MASETTO *et al.*, 2011), dentre eles o linalol e o acetato de linalol (GONÇALVES & ROMANO, 2013).

2.3. *Lavandula dentata* L.

Lavandula dentata L. é um pequeno arbusto perene nativo do Mediterrâneo (Figura 1), que cresce em terreno rochoso e árido com touceiras de hastes quadrangulares e lenhosas (BOUSMAHA *et al.*, 2006).

Conhecido popularmente como lavanda, lavandin e alfazema (RIVA, 2012; SUDRIÁ *et al.*, 2001), é utilizado na medicina popular como antidiabético (quando administrado em suspensão ou infusão), contra resfriado comum, para cólica renal,

como antiespasmódico, anti-hipertensivo e antiprotozoário (DUARTE & SOUZA, 2014; BONA *et al.*, 2010; BOUSMAHA *et al.*, 2006). Também é utilizado na ornamentação e como planta melífera (MACHADO *et al.*, 2011).

O óleo volátil obtido é armazenado em glândulas especializadas encontradas abundantemente na superfície das folhas. Este óleo pode ser resultado do aumento da biossíntese ou redução do catabolismo (SUDRIÁ *et al.*, 2001). Quimicamente *Lavandula dentata* pode apresentar os seguintes flavonoides: genkwanina, luteolina, apigenina, luteolina 7-glicosídeo, apigenina 7-glicosídeo, luteolina 7-rutinosídeo, vitexina e vicenina-2 (IMELOUANE *et al.*, 2009; UPSON, 2000). Também pode apresentar monoterpenos oxigenados como o 1,8-cineol e a cânfora, que conferem ação antiespasmódica, antifúngica, bactericida, anti-inflamatória, analgésica, gastro protetora, repelente e inseticida ao óleo volátil (CALDAS *et al.*, 2015; MASETTO *et al.*, 2011).



Figura 1. Aspecto geral de *Lavandula dentata*.
Fonte: O autor, 2015.

2.4. ÓLEOS VOLÁTEIS

Os óleos voláteis apresentam diversas aplicações, seja na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, sanitária ou agrônômica (ORLANDA, 2011; BOSCARDIN, 2009). Além disso, os óleos voláteis têm sido utilizados na aromaterapia para a promoção da saúde (RUSSO *et al.*, 2015). A composição química dos óleos tem sido

utilizada para caracterizar e diferenciar espécies vegetais medicinais, visto que, atualmente cerca de 3.000 óleos voláteis são conhecidos, porém apenas 300 apresentam características relevantes (RUSSO *et al.*, 2015; BUDEL *et al.*, 2012). As plantas aromáticas geralmente crescem em áreas restritas, temperadas e quentes, como o Mediterrâneo e alguns países tropicais (RUSSO *et al.*, 2015).

Esses óleos são altamente voláteis e se apresentam como uma mistura complexa de 20 a 70 substâncias aromáticas em diversas concentrações derivadas do metabolismo secundário, sendo elas, lipofílicas que são sintetizadas, armazenadas e liberadas por estruturas secretoras (RUSSO *et al.*, 2015; YAP *et al.*, 2014). Essas estruturas podem ser tricomas glandulares, dutos secretores, células oleíferas, entre outros, e podem ser encontrados em todas as partes da planta, como cascas, caules, raízes, frutos e folhas variando sua composição de acordo com o órgão vegetal (ARAÚJO *et al.*, 2015; RUSSO *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015; BUDEL *et al.*, 2012; SIMÕES *et al.*, 2007). Os óleos voláteis apresentam diversas propriedades como antimicrobiana, antiviral, antidepressiva, relaxante, sedativa, digestiva, diurética, hormonal, inseticida, repelente, mucolítica, expectorante, desodorante, anti malárica, anticarcinogênica, anti convulsionante, antioxidante, antiespasmódica, gastro protetora e anticolinesterásica (MASETTO *et al.*, 2011; ORLANDA, 2011; IMELOUANE *et al.*, 2009; UPSON, 2000).

Baseados em estruturas químicas, os óleos podem apresentar terpenos hidrocarbonados sendo eles monoterpenos, sesquiterpenos ou diterpenos, terpenos oxigenados como álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, lactonas, cumarinas, fenilpropanoides, entre outros. Monoterpenos são os constituintes mais abundantes e a atividade citotóxica tem sido atribuída a presença de fitocomplexos (RUSSO *et al.*, 2015). A sua quantidade depende das condições de coleta e extração, das partes utilizadas, da espécie utilizada e podem atuar contra vírus, fungos, bactérias e protozoários (PROBST, 2012).

Segundo Oliveira *et al.* (2015), as pesquisas atuais giram em torno do uso dos óleos voláteis para o desenvolvimento de terapias para o câncer em substituição as já utilizadas. Estas pesquisas mostram que a utilização do óleo volátil total tem efeito mais significativo que o uso dos componentes majoritários isolados. Além disso, o óleo obtido é mais concentrado e pode apresentar uma toxicidade maior contra vários tipos de câncer.

2.5. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS VOLÁTEIS

2.5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Considerando a utilização de antimicrobianos em altas e repetidas doses, o processo de tolerância e resistência microbiana necessita do desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de infecções patogênicas (YAP *et al.*, 2014; MOTHANA *et al.*, 2009). As pesquisas recentes têm como justificativa o surgimento de novas espécies de microrganismos e novos perfis de resistência comparados aos antimicrobianos convencionais (MENDES *et al.*, 2011). Os produtos derivados de plantas aromáticas possuem diversas vantagens, a saber: são mais aceitos pelos pacientes, apresentam menos efeitos adversos, tem melhor biodegradabilidade e tem custo relativamente baixo (YAP *et al.*, 2014). O emprego dos óleos voláteis, produtos do metabolismo secundário de plantas aromáticas, com o objetivo de conter a multiplicação bacteriana, pode ser explicado por diversos mecanismos dependentes de sua composição, estrutura e grupos funcionais.

Considerando diversas substâncias químicas, a ação pode não ser aplicada a um único composto e sim a um sinergismo de compostos químicos (YAP *et al.*, 2014; CANTON *et al.*, 2010). Dentre os mecanismos conhecidos estão a coagulação do citoplasma, alteração na membrana plasmática, nas proteínas de membrana e a degradação da parede bacteriana (CANTON *et al.*, 2010).

O potencial antimicrobiano das espécies da família Lamiaceae, vem sendo avaliado desde 1990, onde Deans & Svoboda revelaram que o óleo volátil de *Origanum majorana* L. apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Já em 1993, Biondi *et al.* demonstrou que *Origanum onites* L. e *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link apresentam atividade antibacteriana e antifúngica. Ainda que *O. onites* especificamente contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Em 2002, *Mentha piperita* L. e *Lavandula × hybrida* Balb. ex Ging. apresentam atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ARLDOGAN *et al.*, 2002).

Em 2014, Benbelaid *et al.* relatou uma excelente atividade de espécies da família Lamiaceae, como *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) letsw. e *Thymbra capitata* (L.) Cav. sobre *Enterococcus faecalis* com um grande potencial médico e econômico, visto que é uma bactéria altamente relacionada com infecções

nosocomiais.

2.5.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As espécies reativas de oxigênio são bem conhecidas por danificar os constituintes celulares, como o DNA, as proteínas, lipídeos e por atuar como segundo mensageiro na inflamação. As substâncias antioxidantes conseguem reduzir estas espécies, reduzir as vias de inflamação e estão sendo testadas em doenças cardíacas, diabetes, Alzheimer, câncer, arteriosclerose e acidente vascular cerebral (MOTHANA *et al.*, 2009), danos na membrana celular e envelhecimento (HOSSAIN *et al.*, 2010).

O oxigênio é um elemento essencial para o desenvolvimento e sobrevivência da planta, porém também pode ser tóxico através do ATP produzido pela cadeia de respiração mitocondrial com a liberação de superóxido dentro da célula. Esta forma reativa pode se transformar em espécies não radicais e/ou radicais livres que levam a um dano nas moléculas biológicas (lipídeos, proteínas, enzimas e DNA) (KAISER, 2014; FUCHS-TARLOVSKY, 2013; PERERA *et al.*, 2011; BOZIN, 2006; DUTHIE, 2003; HOLDEN, 1994). Existem outras formas que podem levar a um dano oxidativo, dentre elas, as fontes endógenas e exógenas como a radiação ionizante, a luz ultravioleta, compostos clorados, fumo, xenobióticos, entre outras, que também estão envolvidas no desenvolvimento de muitas doenças (DUTHIE, 2003; FUCHS-TARLOVSKY, 2013).

Recentemente, há um aumento do interesse em compostos antioxidantes naturais pelas indústrias alimentícias como substitutos dos antioxidantes sintéticos. Estes, como BHA e BHT, possuem uso restrito dado a segurança duvidosa (HOSSAIN *et al.*, 2010). Diante disso, os estudos mais recentes sugerem que a alimentação ocidental contém os antioxidantes suficientes para a prevenção de algumas patologias como doença arterial coronariana, derrame, câncer, artrite reumatoide e Alzheimer. Sabe-se que a ingestão de antioxidantes é inversamente proporcional ao risco dessas e outras patologias (DUTHIE, 2003). Neste contexto, os óleos voláteis e os produtos do isolamento químico deles podem agir como fortes antioxidantes naturais (substituindo os sintéticos já disponíveis), por conterem normalmente em sua estrutura química um anel benzênico com uma hidroxila funcional

que atua como doador de elétrons (BERDOWSKA *et al.*, 2013; AMIRI, 2012; BOSCARDIN, 2009; BOZIN, 2006).

Várias espécies de *Lamiaceae* já demonstraram potencial antioxidante anteriormente como *Melissa officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (HUSSAIN *et al.*, 2011). Além destas, as espécies de *Lavandula* também apresentam potencial, tanto com o extrato, como *Lavandula vera* DC. (KOVATCHEVA *et al.*, 2001) e *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur (TORRAS-CLAVERIA *et al.*, 2007), como os óleos voláteis, a exemplo de *Lavandula angustifolia* Mill., *Lavandula stoechas* L. e *Lavandula latifolia* Medik. apresentando valores de IC50 variando de 29,2 a 95,1 µg/mL pelo ensaio do DPPH (SARIRI *et al.*, 2009).

2.5.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA

Altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o oxigênio singlete (O^2), íon superóxido (O_2^-), íon hidroxil (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) têm sido consideradas promotoras de câncer (AMIRI, 2012; PERERA *et al.*, 2011). As células tumorais podem gerar um estresse celular por mutações oncogênicas e mudanças no metabolismo levando a uma formação de produtos tóxicos como as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 2). Os níveis elevados de ROS podem levar ao desenvolvimento de tumores de várias formas, entre elas a indução do dano ao DNA acelerando as taxas de mutações, ativando vias inflamatórias e estabilizando o fator de hipóxia induzida (regulador-chave do metabolismo de energia) (PERERA, 2011).

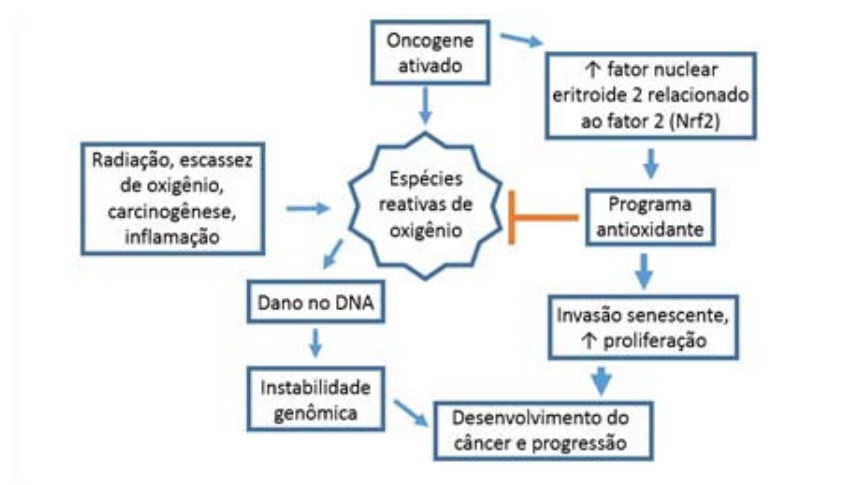


FIGURA 2. Relação entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), o câncer e o programa carcinoantioxidante.

Fonte: Traduzido de PERERA *et al.*, 2011.

Atualmente existe um modelo de multiestágios para o desenvolvimento do câncer. Em uma única célula pode ocorrer a iniciação (1), promoção (2) e progressão (3). Não se pode esquecer que as ROS podem atuar nos três estágios e tem como característica principal a indução da proliferação celular e/ou inibição da morte programada (apoptose). Partindo do estágio pré-neoplásico, onde ocorre uma mudança celular e molecular, para o estágio neoplásico há um acúmulo do dano genético e formação irreversível de uma célula maligna. Esta célula é caracterizada pela instabilidade genética e disruptura da integridade cromossômica (Figura 3) (FUCHS-TARLOVSKY, 2013).

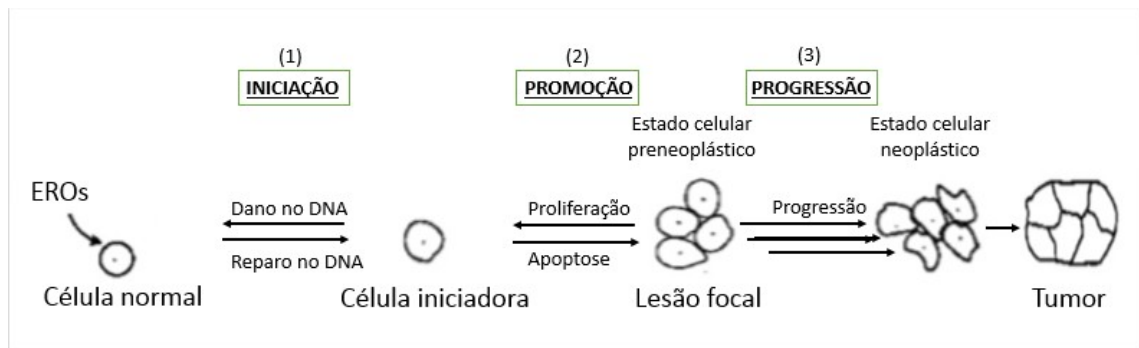


FIGURA 3. O modelo dos três estágios da carcinogênese.
Fonte: Traduzido de FUCHS-TARLOVSKY, 2013.

Dois principais tipos de morte celular acontecem normalmente, por substâncias ou em patologias: apoptose e necrose (PETER, 2011). A apoptose, também chamada de “suicídio celular”, é um conjunto de alterações morfológicas dependentes de ATP: retração e fragmentação nuclear, condensação da cromatina, *blebs* de membrana e a liberação de corpos apoptóticos. Este mecanismo pode ser ativado de várias formas e necessita de eventos que às vezes são próprios para a manutenção da célula. A apoptose não acontece somente de uma forma, por isso a dificuldade de se avaliar. Ela apresenta diferentes padrões de morte, diferentes cinéticas de morte e de fagocitose, bem como diferentes respostas do fagócito e do organismo (MEVORACH *et al.*, 2010).

No entanto, a necrose ocorre quando a célula não consegue mais manter a integridade de membrana. Este processo não necessita de energia, ele se inicia com uma sobrecarga de processos intracelulares que geram descontrole energético e termodinâmico. Há muitas formas de indução que podem levar a uma lise imediata ou a uma alteração na morfologia celular, como a congelação e descongelação, a

exposição ao peróxido de hidrogênio, aquecimento, entre outras. Para a avaliação pode-se utilizar a dispersão da luz no citômetro de fluxo ou por meio de observação direta ao microscópio (MEVORACH *et al.*, 2010).

Levando em conta o tratamento do câncer, patologia esta que tem aumentado de maneira considerável por todo o mundo (GUERRA *et al.*, 2005), existe uma complicação, a resistência a múltiplas drogas. A resistência se dá quando as células cancerosas perdem a sua sensibilidade a múltiplos agentes quimioterápicos estruturalmente diferentes. Por isso, atualmente, a busca de fitoquímicos que sensibilizem as células cancerosas à ação de medicamentos é também uma importante área de pesquisa (GAUTAM *et al.*, 2014; BERDOWSKA *et al.*, 2013).

Os óleos voláteis vêm sendo explorados por apresentarem potencial de indução de morte celular por apoptose e/ou necrose, parada no ciclo celular e perda da função de organelas. Esta atividade tem sido atribuída a substâncias lipofílicas e de baixo peso molecular, que poderiam facilitar a entrada pela camada fosfolipídica, aumentar a fluidez da membrana e levar a uma ligação de íons e conteúdos citoplasmáticos. Dentre os distúrbios intracelulares provocados estão a redução da produção de ATP, perda do potencial mitocondrial, alteração do gradiente de pH, além de afetar o estado redox (RUSSO *et al.*, 2015).

Alguns estudos já relataram a atividade citotóxica de alguns óleos voláteis, como o óleo de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher) Cheell que apresentou efeito citotóxico tempo dependente em células de mesotelioma murino e melanoma com parada no ciclo celular e morte celular por necrose e baixos níveis de apoptose (GREAY *et al.*, 2010).

Outros trabalhos reportam esta atividade para espécies de Lamiaceae, como Sousa *et al.*, que em 2004 atribuiu a *Melissa officinalis* L. quando apresentou citotoxicidade para células de câncer de pulmão, cólon, de mama e de leucemia HL-60 e K562. *Salvia bracteata* Banks & Sol. e *Salvia rubifolia* Boiss. com células de melanoma humano M14 com indução apoptótica e *Salvia officinalis* L. com células M14, A357 e A2058. *Salvia miltiorrhiza* Bunge em células de hepatoma com morte celular por apoptose (RUSSO *et al.*, 2015). E também para o gênero *Lavandula* como *L. angustifolia* que atua como antiproliferativo em células de carcinoma de boca epidérmico e de leucemia murina e *L. stoechas* que possui atividade citotóxica sobre células de carcinoma epidermoide humano, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cólon, leucemia, câncer de próstata hormônio-dependente (GAUTAM *et al.*,

2014).

2.6. CÉLULAS CALU-3

As células Calu-3 (Figuras 4 e 5) são células epiteliais da submucosa de adenocarcinoma de pulmão derivadas de um sítio metastático de um homem caucasiano de 25 anos (ATCC, 2014). A linhagem de células Calu-3 (ATCC HTB-55) é bem característica e bem diferenciável. Ela é derivada de glândulas da submucosa brônquica humana, esta que *in vivo* é a maior fonte de líquido da superfície das vias aéreas, mucinas e outras substâncias imunologicamente ativas. As células Calu-3 refletem as propriedades do epitélio bronquiolar além de serem cultivadas em uma interface líquido/ar que não deixa a camada de ar inspirado entrar em contato com outros tecidos viscerais (ZHU *et al.*, 2010).

Esta linhagem celular possui várias aplicações farmacêuticas como vetorização de fármacos para o pulmão, estudos com aerossóis, transporte de fármacos (permeabilidade de fármacos, estudo de mecanismos de absorção, interação de fármacos), alternativa para estudos de liberação modificada, correlação *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (ONG *et al.*, 2013).

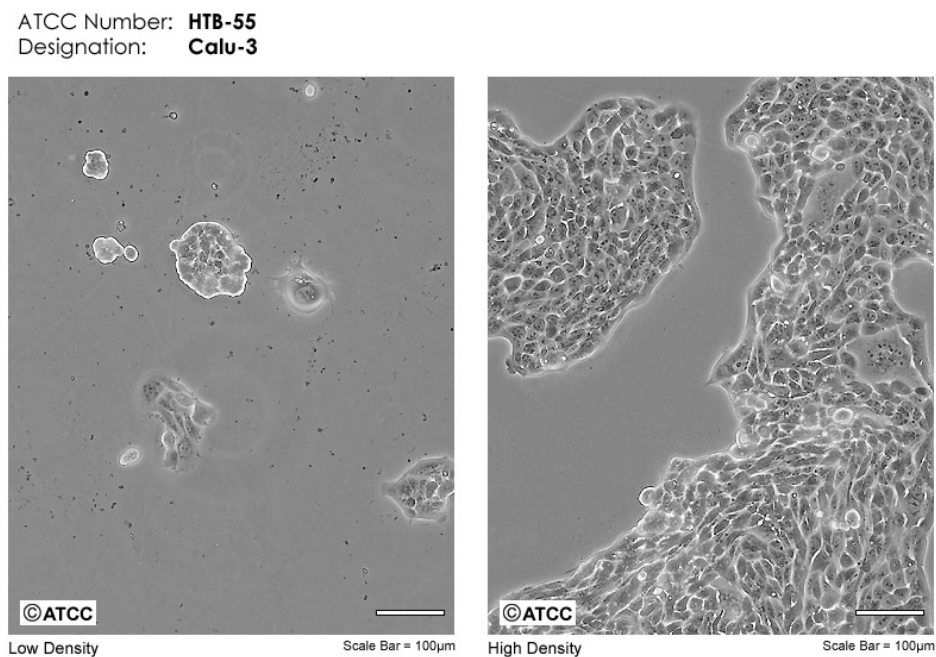


FIGURA 4. Aspecto geral das células Calu-3 (ATCC HTB-55) em baixa e alta densidade. Fonte: AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2014.

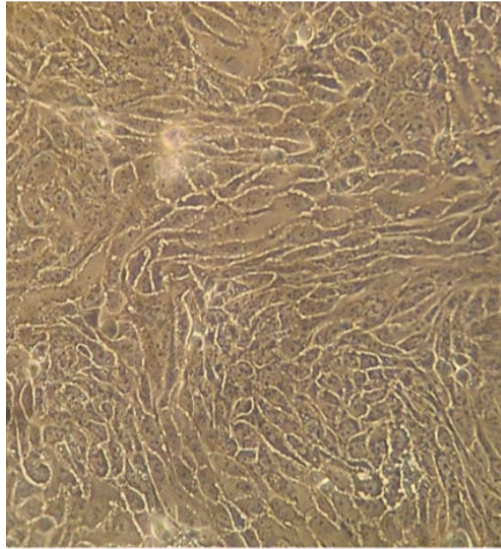


FIGURA 5. Aspecto geral das células Calu-3 em microscopia confocal.
Fonte: GEORGE *et al.*, 2015.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar estudos morfoanatômicos das partes vegetativas aéreas da espécie *Lavandula dentata* L. e obter, caracterizar e avaliar a atividade biológica do seu óleo volátil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar *Lavandula dentata* morfoanatomicamente;
- Realizar a extração do óleo volátil de *Lavandula dentata*;
- Determinar o teor do óleo volátil de *Lavandula dentata*;
- Caracterizar quimicamente o óleo volátil de *Lavandula dentata*;
- Realizar testes de atividade antimicrobiana com o óleo volátil de *Lavandula dentata*;
- Avaliar a capacidade antioxidante do óleo volátil de *Lavandula dentata*;
- Avaliar a citotoxicidade do óleo volátil de *Lavandula dentata* sobre linhagem tumoral humana de pulmão, Calu-3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletadas partes vegetativas aéreas de *Lavandula dentata* L. durante os anos de 2014 e 2015, pela manhã, no Horto Medicinal do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa – Campus Uvaranas (25°5'23"S 50°6'23"W) em Ponta Grossa, Paraná – Brasil. Os exemplares foram submetidos à confecção de exsicatas, identificados por taxonomista e estão registrados no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM) sob o número 390597.

4.2. ESTUDO MORFOANATÔMICO

As pesquisas referentes aos caracteres morfoanatômicos foram efetuadas com as folhas e os caules de *Lavandula dentata*. O material vegetal foi fixado em FAA 70 (formalina, ácido acético e álcool etílico 70°GL) (JOHANSEN, 1940) e estocado em etanol a 70 % (BERLYN, MIKSCHE, 1976).

4.2.1. LÂMINAS SEMIPERMANENTES

Foram preparadas lâminas semipermanentes com o material seccionado nos sentidos transversal e longitudinal, à mão livre, submetidos à coloração de fucsina básica e azul de astra (ROESER, 1972) ou de azul de toluidina (O'BRIEN, FEDER, MCCULLY, 1964). As lâminas foram montadas com glicerina diluída a 50% (BERLYN, MIKSCHE, 1976) e para a lutagem foi utilizado esmalte incolor.

4.2.2. TESTES MICROQUÍMICOS

Para os testes microquímicos foram feitas secções transversais à mão livre do material. Os reativos empregados foram: solução de floroglucina clorídrica para verificação de lignina (FOSTER, 1949), Sudam III para compostos lipofílicos (SASS, 1951), cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940) e lugol para amido (BERLYN, MIKSCHE, 1976). Os resultados foram registrados por meio de

fotomicrografias no microscópio fotônico Olympus CX31, acoplado a câmera C7070 do Laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.2.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foi realizada a análise ultra-estrutural de superfície (microscopia eletrônica de varredura - MEV) (SOUZA, 1998) em alto vácuo. Para tal procedimento, as amostras foram fixadas em FAA 70 e desidratadas em série etanólica crescente. Após montagem em suporte, foram submetidas à desidratação pelo ponto crítico e a metalização com uma liga de ouro e paládio em aparelho Quorum Technologies, modelo SC7620 Mini Sputter Coater. As eletromicrografias foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura VEGA3 TESCAN no Complexo de Laboratórios Multiusuários, na Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.2. EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ÓLEO VOLÁTIL DE *Lavandula dentata* L.

Dentre os métodos mais empregados para a obtenção do óleo volátil, destaca-se a destilação por arraste de vapor. Neste, a água em um balão volumétrico, sobre uma manta de aquecimento, entra em ebulição e os vapores da água passam sob pressão no recipiente com o material vegetal arrastando o óleo (ORLANDA, 2011).

O óleo volátil extraído durante os anos de 2014 e 2015 foi determinado quantitativamente a partir de 100 g das folhas e caules dessecados da espécie em estudo. A extração foi realizada por meio de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger (USP XXXVII, 2014), com duração de 6 horas. Após esse tempo, foi determinado o teor de óleo volátil extraído de 100 g pela medição direta no tubo graduado. O material obtido foi estocado em tubos de 2 mL, em temperatura de $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

4.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO VOLÁTIL DE *Lavandula dentata* L.

Para a caracterização dos componentes do óleo volátil geralmente é utilizada a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (GC-MS). Na

cromatografia gasosa há uma separação e análise das substâncias voláteis. A amostra é vaporizada, através de uma coluna cromatográfica e uma fase estacionária onde os componentes são separados. Com um detector eles são identificados através de um sinal elétrico formando o cromatograma. Quando acoplado a um espectrômetro de massa, um bombardeio de elétrons gera radicais, íons positivos e negativos com as respectivas razões massa/carga (m/z) e assim identificando e quantificando os compostos químicos (HAMID *et al.*, 2011; EWING, 2002).

A análise dos compostos voláteis do óleo obtido foi realizada em parceria com a Universidade Federal do Paraná. O óleo volátil foi seco com sulfato de sódio anidro e armazenado em frascos de vidro selados com tampas de Teflon a $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ na ausência de luz até ser utilizado. A identificação dos constituintes voláteis foi realizada utilizando um cromatógrafo de gás (GC) Hewlett-Packard 6890, equipado com um detector de massa seletivo (MS) Hewlett-Packard 5975 e coluna capilar HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). GC-MS foi realizada utilizando injeção *splitless*, com injetor fixado em 220°C , ajustado a 60°C em coluna, com rampa de aquecimento de $3^\circ\text{C}/\text{minuto}$, temperatura final a 240°C e o detector foi fixado em 250°C . Hélio foi utilizado como gás transportador a 1 mL/minuto. O sistema de ionização de elétrons por GC-MS foi de 70 eV. A análise quantitativa foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso da Hewlett-Packard 5890 equipado com um detector de ionização de chama (FID) nas mesmas condições anteriormente descritas.

Uma amostra do óleo volátil foi dissolvida em acetato de etila (20 mg/mL), durante as análises. Os índices de retenção (IR) foram determinados por injeção de padrões de hidrocarbonetos e do óleo volátil de *L. dentata* nas mesmas condições. Os componentes do óleo volátil foram identificados por comparação com os dados da literatura e os perfis das bibliotecas de espectros de massa (Wiley 139, 275, 7 e NIST 127). A quantificação foi obtida utilizando um GC-FID e foi expressa como média de três amostras do óleo volátil extraído.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Para a avaliação da atividade antimicrobiana são utilizados os ensaios *in vitro*, realizados por difusão, diluição ou bioautografia (BOSCARDIN, 2009). Através do

ensaio de microdiluição em caldo (MIC) (NCCLS, 2003) é possível determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microrganismo. Neste teste são feitas diluições consecutivas do óleo volátil e aplicadas a um determinado isolado bacteriano. Assim, ao concluir o teste, obtém-se a Concentração Inibitória Mínima, ou seja, a concentração mínima necessária para inibir o crescimento de um microrganismo (ANDREWS, 2001).

Neste ensaio, conforme preconizado pelo NCCLS (2003), as bactérias foram inoculadas em caldo BHI (*brain heart infusion*), sendo a concentração de microrganismos ajustada em comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland, para padronização dos inóculos de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027, *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615. A mesma metodologia foi utilizada para o fungo *Candida albicans* ATCC® 10231, substituindo-se o meio de cultura por caldo Sabouraud. Microplacas contendo os inóculos em contato com o óleo volátil, nas concentrações de 437,5; 218,8; 109,4; 54,7 e 27,3 µg/mL, foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C e o crescimento microbiano foi observado após 24 horas de incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente, utilizando-se o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 3%, do qual 25 µL foram adicionados em cada orifício das microplacas. No decorrer de 30 minutos os poços em que houve inibição do crescimento bacteriano, permaneceram incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano ficaram corados de vermelho (DUARTE *et al.*, 2005). Desta forma, a presença desta cor nos orifícios foi interpretada como prova negativa de efeito inibitório do óleo volátil. O conteúdo do poço onde a mínima concentração da amostra inibiu o crescimento foi transferido para uma placa de Petri contendo ágar BHI ou Sabouraud. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. A detecção da presença microbiana na placa indicou que a amostra não possui capacidade de inibir o crescimento, enquanto que a ausência microbiana indicou que a amostra possui capacidade de provocar a morte celular dos microrganismos e assim determinou-se a concentração bactericida mínima (CBM).

4.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1. MÉTODO DE REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Para avaliação da capacidade antioxidante dos óleos voláteis pode ser utilizado o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), que é um radical livre estável. Isto se dá em virtude da deslocalização do elétron de reposição através da molécula como um todo o que dá origem a cor violeta, quando em solução etanólica. Este método se baseia na capacidade de redução do nitrogênio da molécula do DPPH• pelo recebimento de um átomo de hidrogênio da molécula antioxidante e a perda da coloração violeta que pode ser analisada por espectrofotometria (KEDARE & SINGH, 2011).

Utilizando-se da metodologia descrita por Chen *et al.* (2003) e Yen e Wu (1999), o óleo volátil foi diluído nas concentrações de 25; 20; 15; 10; 5mg/mL em metanol, assim como os padrões utilizados, o ácido gálico (Merck®) e a rutina (Merck®). Em uma placa de 96 poços foi colocado 20 µL da amostra e dos padrões com 100 µL do reativo de DPPH•. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando o metanol como branco. A porcentagem da capacidade antioxidante das amostras testadas foi obtida por meio dos valores de absorvância (A) obtidos após 30 minutos em leitora de placas (Biotek, µQuant) em um comprimento de onda de 517 nm de acordo com a Equação 1.

EQUAÇÃO 1. Cálculo da porcentagem de inibição do DPPH•.

$$\% \text{ de Inibição DPPH} \bullet = 100 - \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}})}{A_{\text{controle}}}$$

4.5.2. MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO

O método do complexo fosfomolibdênico, fundamenta-se na redução do molibdênio (VI), que inicialmente possui uma coloração amarelada, a molibdênio (V) pela atuação de substâncias antioxidantes. Esta reação entre fosfato/molibdênio (V) apresenta uma coloração verde em pH ácido que é determinada por espectrofotometria (BALESTRIN *et al.*, 2008).

Com a metodologia de Prieto, Pineda e Aguilar (1999), o complexo foi formado pela reação da solução de Na₃PO₄ (0,1 mol/L) com solução de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (0,03mol/L) e solução de H₂SO₄ (3 mol/L), em meio aquoso. As amostras de óleo

volátil foram diluídas em etanol a uma concentração de 200 µg/mL, assim como o ácido ascórbico (Merck®), o ácido gálico (Merck®) e a rutina (Merck®). Como branco foi utilizado o etanol e o reativo. Os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após o resfriamento dos tubos, as leituras das absorvâncias (A) foram realizadas em espectrofotômetro (UV/Vis SHIMADZU-1601) a 695 nm. A determinação da capacidade antioxidante relativa ao ácido ascórbico, foi determinada em porcentagem (AAR%), utilizando a Equação 2.

EQUAÇÃO 2. Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico.

$$AAR\% = \frac{A_{amostra} - A_{branco}}{A_{ácido\ ascórbico} - A_{branco}} \times 100$$

A capacidade antioxidante da rutina e do ácido gálico foi calculada da mesma forma pela divisão do valor de sua absorvância pelo valor de absorvância da atividade padrão do ácido ascórbico, utilizando a Equação 2.

4.5.3. MÉTODO DE DESCOLORAÇÃO DO RADICAL ABTS•⁺ (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico])

O 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico (ABTS•⁺) também pode ser utilizado para avaliar a capacidade antioxidante. Este ensaio tem como fundamento a ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença do ABTS•⁺ para produzir o cátion. Uma técnica melhorada sugere a adição de persulfato de potássio à solução de ABTS•⁺ para a produção de um cromóforo azul esverdeado. A adição de antioxidantes a esta solução com o cátion pré-formado reduz o ABTS•⁺, perdendo a coloração esverdeada e podendo assim realizar a leitura em espectrofotômetro (RE *et al.*, 1999).

Soluções aquosas de ABTS•⁺ (7 mmol.L⁻¹) e persulfato de potássio (2,45 mmol.L⁻¹) foram misturadas em uma proporção volumétrica de 1:1 e incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 12 horas para a obtenção do radical catiônico ABTS•⁺ (RE *et al.*, 1999). Esta solução foi diluída em 50 mmol.L⁻¹ em uma solução tampão fosfato de sódio pH 7,4. Diluições do óleo volátil e dos padrões rutina (Merck®) e ácido gálico (Merck®) foram preparadas em etanol. Uma alíquota (10 µL) das amostras e dos padrões foi colocada com o reativo (190 µL) e incubadas no

escuro por 30 minutos. A leitura das absorvâncias (A) foi realizada em leitora de placas (Biotek, µQuant) no comprimento de onda de 734 nm. Para o cálculo da capacidade antioxidante (AA) utilizou-se a seguinte fórmula:

EQUAÇÃO 3. Cálculo da porcentagem de atividade antioxidante pelo método do ABTS^{•+}.

$$\%AA = 100 - \left(\frac{A_{amostra} - A_{branco}}{A_{reativo}} \right) \times 100$$

4.6. LINHAGEM CELULAR, CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ÓLEO VOLÁTIL EM CÉLULAS CALU-3

A linhagem celular Calu-3 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e se caracteriza por se desenvolverem de forma aderida. As células foram cultivadas rotineiramente em meio RPMI 1640 contendo 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 2000 mg/L de bicarbonato de sódio e soro fetal bovino 10%.

Para avaliação da citotoxicidade da fase líquida do óleo, as células foram semeadas na concentração de 2×10^5 células/mL em placas de 96 poços. Após 24 horas de cultivo, foi adicionado meio de cultura com diferentes concentrações do óleo volátil 62,5; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000 µg.mL⁻¹ e as células foram cultivadas por 72 horas. Uma solução de 75% de Etanol p.a. e 25 % de Propilenoglicol, foi utilizada como veículo para solubilização do óleo. Cumpre ressaltar que esse veículo não foi citotóxico estando presente em concentração inferior a 0,5% em cultura. As células que se desenvolveram em meio de cultura contendo apenas o veículo foram denominadas controle negativo (Ctrl).

A avaliação da citotoxicidade da fase vapor do óleo volátil foi realizada utilizando-se da metodologia descrita por Seal *et al.* (2012), modificada. As células Calu-3 foram semeadas na concentração de 5×10^4 células/mL em placas de 24 poços, mantendo poços desprovidos de células onde foi adicionado uma solução com óleo volátil em diferentes concentrações, conforme demonstrado na Figura 6.

As células foram colocadas para aderir durante 24 horas. Após a aderência, foram adicionados 1000 µL de meio RPMI com óleo volátil de *L. dentata* L. solubilizado em um veículo (75% Etanol p.a. + 25% Propilenoglicol) nas concentrações de 500, 750 e 1000 µg.mL⁻¹, sendo que cada placa de cultivo

apresentou óleo em apenas uma concentração, da mesma forma que o controle também foi colocado em uma placa isolada.

Para a avaliação da fase líquida, as soluções tanto do óleo, quanto do controle, foram colocadas sobre as células aderidas e entraram em contato com as mesmas. Entretanto, quando avaliado a fase vapor, as soluções foram colocadas em poços ao lado dos que foram utilizados para o plaqueamento celular (Figura 6 – poços de coloração roxa). Vale ressaltar que estas soluções para fase vapor não entraram em contato com as células, por isso foram testados apenas os compostos que se volatilizaram a 37°C. Por fim, as placas foram incubadas por 72 horas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

A						
	1	2	3	4	5	6
A		C		C		C
B		C		C		C
C		C		C		C
D		C		C		C

B						
	1	2	3	4	5	6
A						
B		C	C	C	C	
C		C	C	C	C	
D						

Figura 6. Modelo ilustrativo do plaqueamento das células Calu-3 para determinação da citotoxicidade (A) e para a busca do mecanismo de ação (B) da fase vapor do óleo volátil.

Nos poços com coloração roxa foi colocado o óleo volátil em uma concentração única, 500, 750 ou 1000 µg/mL por placa. Nas colunas em branco com C, foram semeadas as células Calu-3. O controle foi realizado em placa separada daquelas de tratamento com o óleo e contou com o veículo de solubilização do óleo volátil.

4.6.1. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

4.6.1.1. ENSAIO DE METABOLISMO CELULAR DE REDUÇÃO DO MTT

Um dos ensaios de viabilidade celular é o metabolismo celular de redução do (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), o MTT. Uma reação de cor para medida do número de células viáveis. O anel de tetrazólio desta substância é clivado nas mitocôndrias ativas, formando cristais de formazan de coloração violeta que podem ser lidos por espectrofotometria quando solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (MOSMANN, 1983).

Após 72 horas do tratamento descrito no item 4.6, o sobrenadante foi desprezado e 400 µL de uma solução de MTT a 0,5 mg.mL⁻¹ foi adicionada às células, seguindo a metodologia de Mosmann (1983). Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C durante 2 horas, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais de formazan. Para a solubilização destes cristais, 200 µL de dimetilssulfóxido (DMSO) foi acrescentado. A leitura espectrofotométrica da absorvância foi realizada em comprimento de onda de 550 nm, em leitora de placas (Biotek, µQuant). Para o cálculo da viabilidade celular (%) utilizou-se a equação a seguir.

EQUAÇÃO 4. Cálculo da porcentagem de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.

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

Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da concentração de óleo eficaz para inibir 50% de crescimento celular (IC50). O valor foi obtido através da análise de Probit e do método dos mínimos quadrados.

4.6.1.2. CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DA SULFARODAMINA B

O ensaio da sulfarodamina B (SRB), também é utilizado para a análise da citotoxicidade desde 1990. Este corante possui habilidade de se ligar a componentes protéicos da célula que foram fixados nos poços de cultura pelo ácido tricloroacético (TCA). SRB é um corante aminoxantano rosa brilhante com dois grupamentos sulfônicos que se ligam a resíduos de aminoácidos em condições de meio ácido e dissociam em meio básico. Como a ligação deste corante é estequiométrica, a quantidade de corante extraído das células é diretamente proporcional à massa celular (VICHAI & KIRTIKARA, 2006).

Para a análise da Sulfarodamina B (SRB), utilizou-se a metodologia descrita por Papazisis *et al.*, 1997 (modificada). Decorrido a incubação de tratamento, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 200 µL de tampão de fosfato de sódio pH 7,4. Em seguida, foram adicionados 200 µL de ácido tricloroacético 10% gelado e as placas foram colocadas na geladeira por 30 minutos,

para fixação das células. Na sequência, as células foram lavadas três vezes com 200 µL de água destilada e permaneceram 24 horas em temperatura ambiente, para secagem. Decorrido este tempo, foram adicionados 200 µL de uma solução de SRB 0,2% e aguardado 30 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com 300 µL de ácido acético 1% e novamente foram secas por 24 horas. Após este período foram adicionados 200 µL de TrisBase 10mM e a leitura espectrofotométrica da absorvância foi realizada em comprimento de onda de 432 nm, em leitora de placas (Biotek, µQuant).

4.6.1.3. ANÁLISE INDIRETA DO CONTEÚDO DE DNA CELULAR – FLUORIMETRIA PI

A análise do conteúdo de DNA celular consiste em avaliar a fragmentação do DNA após o tratamento com iodeto de propídeo (PI). Ele é um composto fluorescente que se intercala no DNA e quando analisado por espectrofotometria pode revelar o potencial citotóxico de uma substância (NICOLLETI *et al.*, 1997).

Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado e sobre as células aderidas foram adicionados 200 µL de uma solução de iodeto de propídio (0,1% de citrato, 0,1% de Triton X-100 e 50 µg/mL de iodeto de propídio) e mantida em contato com as células pelo período de 24 horas ao abrigo da luz, seguindo a descrição de Hooft Van Huijsduijnen *et al.* (2013), modificada. A leitura da fluorescência foi realizada em leitora de placas nos comprimentos de onda de 530 nm (excitação) e 620 nm (emissão). Para o cálculo foi utilizada a Equação 5.

EQUAÇÃO 5. Cálculo da porcentagem de conteúdo de DNA.

$$\% \text{ conteúdo de DNA} = \frac{\text{Fluorescência média da amostra} \times 100}{\text{Fluorescência média do controle}}$$

4.6.2. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E BUSCA PELO MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL EM CÉLULAS CALU-3

4.6.2.1. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA CELULAR POR MEIO DO EMPREGO DO CORANTE ROSENFELD (1947)

As células Calu-3 foram semeadas conforme descrito anteriormente no item 4.6., sendo que para cada poço contendo células foi adicionado uma lamínula. Após 24 horas de tratamento somente com a concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o sobrenadante foi retirado e adicionado 200 μL de corante de Rosenfeld sobre as lamínulas por 4 minutos. Na sequência, 400 μL de água destilada fervida foram adicionadas e aguardado 10 minutos. Para retirar o excesso de corante, a lamínula foi lavada com água corrente rapidamente e após a secagem da lamínula foi realizada a montagem em lâminas com Permount. A morfologia celular foi visualizada em microscópio fotônico Olympus CX31, acoplado à câmera C7070.

4.6.2.2. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MEIO DO EMPREGO DOS CORANTES FLUORESCENTES ALARANJADO DE ACRIDINA COM BROMETO DE ETÍDIO (AO/BE) E HOESCHT 33342

Para avaliar um possível mecanismo de morte celular podem ser realizados testes de avaliação morfológica, dentre eles, os corantes alaranjado de acridina, que permeia todas as células e faz com que o núcleo apareça verde, o brometo de etídio que só permeia as células que já perderam a integridade da membrana citoplasmática e cora o núcleo de vermelho (RIBBLE *et al.*, 2005) e o corante fluorescente Hoescht 33342, excitado com luz ultravioleta, que se liga rapidamente ao DNA revelando se a cromatina nuclear está frouxa ou condensada. Desta forma, pode-se observar claramente o processo de morte por apoptose (AMARANTES-MENDES *et al.*, 1997).

Em placas de 24 poços foram semeadas as células Calu-3 sobre lamínulas conforme o item 4.6. Neste ensaio somente a concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi avaliada. As células também foram tratadas com dois antitumorais (controles positivos), o clorambucil (20 μM) e a vincristina (40 nM). Por fim, foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2 . Após 24 horas de tratamento, os poços foram lavados com 200 μL de tampão fosfato de sódio (pH 7,4). Na sequência foram adicionados 10 μL da mistura de corantes alaranjado de acridina com brometo de etídio (200 $\mu\text{g/mL}$) ou Hoescht 33342 (0,5 $\mu\text{g/mL}$) sobre as lamínulas e estas invertidas sobre as lâminas. A coloração foi visualizada em microscópio óptico de fluorescência Olympus BX41 (filtro com excitação de 480/30 nm e emissão 535/40 nm) e os campos foram registrados com câmera fotográfica Olympus DP71 acoplada.

Os critérios utilizados para a classificação das células submetidas a coloração AO/BE, segundo Ribble e colaboradores (2005), foram:

- a) Células viáveis: núcleos normais e coloração verde;
- b) Células apoptóticas em fase inicial (membranas intactas): núcleo verde e brilhante, porém sem uniformidade com condensação ou fragmentação da cromatina;
- c) Células apoptóticas em fase tardia (perda da integridade da membrana): com condensação de cromatina e áreas alaranjadas no núcleo;
- d) Células necróticas: núcleo laranja uniforme com perda da integridade de membrana.

Já para a análise de detecção de células apoptóticas com o emprego do corante Hoescht 33342, foi observado o formato morfológico do núcleo e da cromatina e detectado a presença de condensação de cromatina (alta intensidade de fluorescência) (AMARANTES-MENDES *et al.*, 1997).

4.6.2.3. ENSAIO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA PELA LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

A quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada no citoplasma é proporcional ao número de células lisadas pelo processo necrótico, ou seja, permeabilização da membrana plasmática (CHAN *et al.*, 2013). A fim de quantificar esta enzima, as células Calu-3 foram semeadas assim como descrito no item 4.6. Após o período de tratamento com a concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o sobrenadante foi coletado em tubo de 2 mL e centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. A determinação da atividade da LDH, foi mensurada em um equipamento ADVIA[®] 1200 – Siemens com o kit LDH DGKC (Kovalent[®]) por meio de uma reação cinética. Foram homogeneizados 20 μL de cada amostra com 1000 μL do mono-reagente. A absorvância foi lida após 1, 2, 3 e 4 minutos em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm. Para o cálculo da atividade de LDH (U/L) foi utilizada a Equação 6.

EQUAÇÃO 6. Cálculo da atividade de LDH (U/L) a partir da variação da absorbância (ΔA) a cada minuto.

$$\frac{\Delta A}{\text{minuto}} \times 8095 = \text{atividade LDH}$$

4.6.2.4. ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

O ensaio de fragmentação do DNA consiste em avaliar o conteúdo de DNA de cada célula, após o tratamento com iodeto de propídeo (PI). Um composto fluorescente que se intercala no DNA e quando analisado por citometria de fluxo revela as alterações no ciclo celular (NICOLLETI *et al.*, 1997). O ciclo celular está dividido em 4 fases: a fase G1, durante a qual a célula cresce devido às sínteses proteicas; a fase S, durante a qual a célula duplica seu DNA; a fase G2 que é uma outra fase de crescimento e a fase M, que representa a divisão celular propriamente dita (BRUCE *et al.*, 2002).

As células Calu-3 foram plaqueadas de acordo com a descrição do item 4.6. para a análise do ciclo celular. Com 24 horas de tratamento, as células foram coletadas e lavadas com tampão de fosfato de sódio pH 7,4. Para analisar a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, as células foram ressuspensas em 200 μ L de uma solução de lise PSSI (50 μ g/ml PI, 0,1% Triton X-100 e 50 μ g/ml RNase) em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) descrita anteriormente por Nicolleti e colaboradores em 1997. Após 30 minutos, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCanto II da Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa Diva (Becton & Dickinson), avaliando-se uma média aproximada de 40.000 eventos por amostra.

4.6.2.5. ANÁLISE DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO DE MITOCÔNDRIA (MTP)

O corante rodamina 123 (RH-123) também pode ser utilizado para elucidar o mecanismo de ação devido a sua acumulação eletroforética nas mitocôndrias e consequente aumento da fluorescência. Ele é empregado para realizar a medição do potencial de membrana orientado pela respiração. As mudanças são induzidas pelo

movimento de prótons que ocorrem através da membrana interna mitocondrial durante a fosforilação oxidativa. Em condições fisiológicas, há extrusão ativa de prótons pela respiração e consumo passivo de prótons através da ATP sintase durante síntese de ATP, além de outras vias. Da mesma forma, a polarização da membrana por adição de substratos respiratórios para mitocôndrias isoladas induz RH-123 aumentando a fluorescência, enquanto a despolarização através da adição de ATP induz recuperação de fluorescência (BARACCA *et al.*, 2003).

Para analisar se houve despolarização mitocondrial por citometria de fluxo, as células Calu-3 foram tratadas conforme descrito no item 4.6. Com 24 horas de tratamento, as células foram lavadas com tampão fosfato de sódio (pH 7,4) e em seguida ressuspensas em 250 µL deste tampão. Em seguida, foram adicionados 5 µL do reagente Rodamine 123 e as células foram incubadas em banho-maria a 37°C. Após 30 minutos, os tubos foram centrifugados a 1700 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e levado para análise em citômetro de fluxo (FACSCanto II da Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa Diva (Becton & Dickinson), avaliando-se uma média aproximada de 30.000 eventos por amostra.

4.6.2.6. ENSAIO DE EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA – ANEXINA V

O ensaio da externalização da fosfatidilserina através da Anexina V conjugada com uma fluoresceína (FITC), pode indicar um processo de morte celular por apoptose. Nele a fluoresceína se externaliza na membrana da célula e se liga à fosfatidilserina e esta ligação pode ser analisada por citometria (VERMES *et al.*, 2000).

Para analisar esta externalização, utilizou-se o ensaio da Anexina V conjugada com uma fluoresceína (FITC) (Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA). Após o tratamento das células conforme descrito no item 4.6., descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de ligação. Uma alíquota de 100 µL desta solução foi colocada em contato com 5 µL do reagente FITC Annexin V (Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA), levemente agitadas em vortex e incubadas em temperatura ambiente (25°C) ao abrigo da luz por 15 minutos. A solução foi diluída em 400 µL de tampão de ligação e levada para análise no citômetro

de fluxo (FACSCanto II da Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa Diva (Becton & Dickinson), avaliando-se uma média de 10.000 eventos por amostra.

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, sendo que, quando necessário, foi empregado o teste *post-hoc* de Tukey. Também foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e média $\pm$ desvio padrão (DP). Valores de P menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism versão 5.03 (San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOANATÔMICA

Morfológicamente, *Lavandula dentata* L. se apresenta como um pequeno arbusto medindo de 0,7-1,0 metro de altura (Figura 7A) com filotaxia oposta cruzada. As folhas são simples e sésseis, com coloração verde-acinzentada, lanceoladas, com consistência carnosa e nervação penínervia. O ápice é obtuso, as margens são crenadas, a base é atenuada e medem de 3-4 cm de comprimento e 3-6 mm de largura (Figura 7B). Apresentam superfície pilosa devido à grande quantidade de tricomas (Figuras 7C, 8A, 10A e B), especialmente na face abaxial assim como *Lavandula angustifolia* Mill. Para diferenciá-la, observa-se que possui um ápice agudo, consistência intermediária entre herbácea e membranácea e margem das folhas recurvadas no sentido abaxial. *Lavandula angustifolia* apresenta folhas com a mesma coloração, com folhas adultas de cerca de 4,5 cm de comprimento e 4 mm de largura, porém sua margem é inteira (RIVA, 2014).

Lamiaceae compreende várias espécies aromáticas que ocorrem em ambientes áridos e, que frequentemente, apresentam características xeromórficas, a exemplo de folha hipostomática, epiderme coberta por numerosos tricomas e cutícula espessa (METCALFE & CHALK, 1950).

A anatomia foliar, compreendendo as características da secção transversal da folha, é importante na descrição das espécies vegetais. Sabe-se que para a família Lamiaceae esta avaliação é bastante útil para a delimitação das taxa a nível de gênero (SALMAKI *et al.*, 2011).

A lâmina foliar de *L. dentata*, em vista frontal, apresentou células epidérmicas com paredes anticlinais ondeadas em ambas as faces. Diferentemente, Duarte & Souza (2014) encontraram paredes anticlinais ligeiramente ondeadas na face adaxial e contorno sinuoso na face abaxial. Alguns fatores abióticos, como a luminosidade, podem influenciar nesta característica. Na maioria das plantas de sombra, as células apresentam contorno sinuoso em ambas as faces da folha. Já nas plantas de sol, as células epidérmicas apresentam contorno reto na face adaxial (WILKINSON, 1979).

Em secção transversal, a epiderme é uniestratificada e coberta por cutícula espessa (Figura 10C) e estriada (Figura 7C) que reagiu positivamente com Sudam III

na análise microquímica (Figura 10C). As células epidérmicas da face adaxial mostram-se maiores que as da face abaxial (Figura 10F). As folhas são hipoestomáticas e mostram estômatos (Figuras 7D e 8D) do tipo diacítico que se encontram no mesmo nível das demais células epidérmicas. Essa característica também foi observada por Duarte e Souza (2014) e por Riva (2014). Folhas hipoestomáticas também foram encontradas em outros gêneros de Lamiaceae (FIUZA *et al.*, 2010). Adicionalmente, ao redor dos estômatos são observadas estrias cuticulares concêntricas e tangenciais (Figuras 7C, D e 8D).

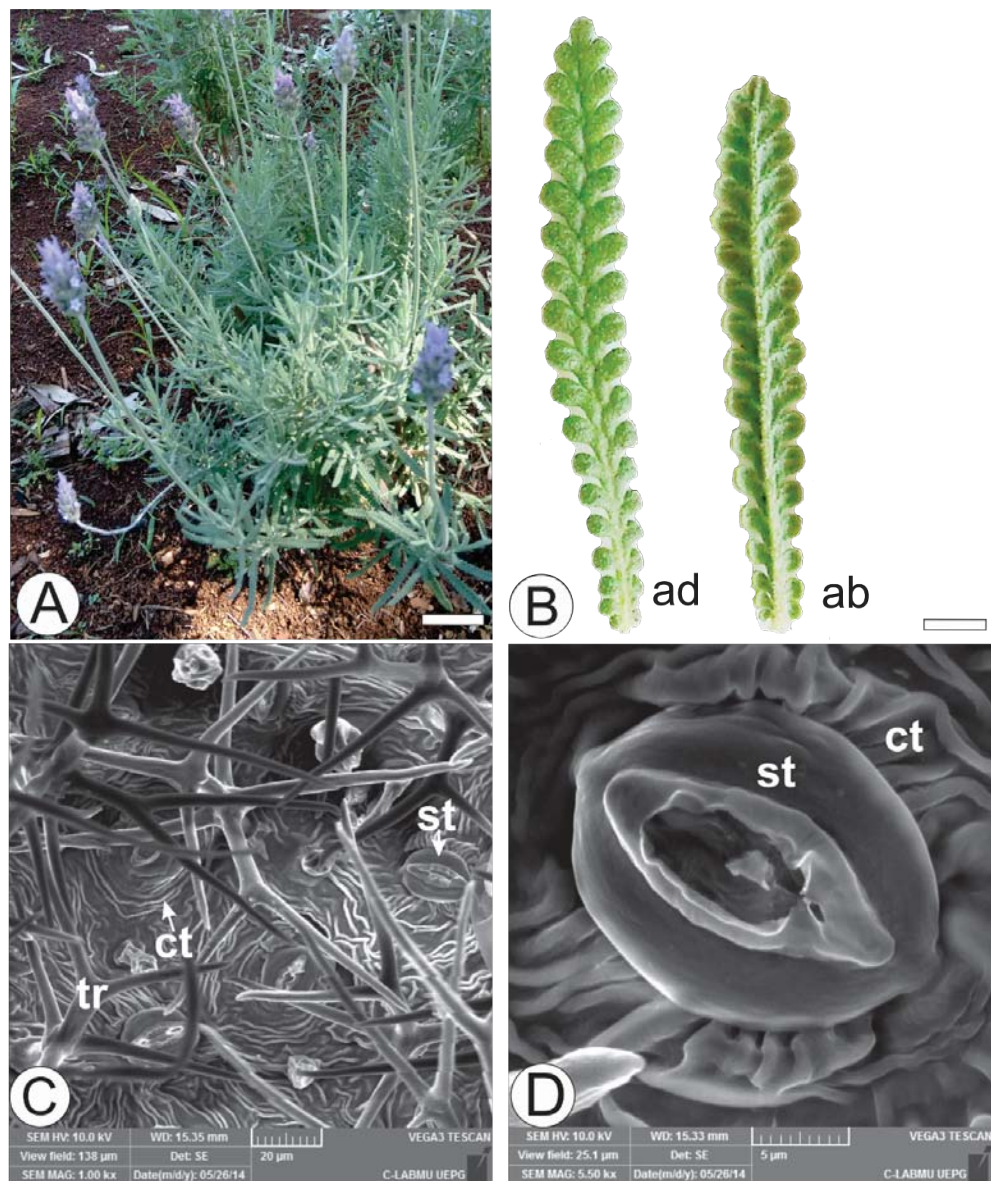


FIGURA 7. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae – Aspectos gerais. A. Aspecto geral das partes aéreas vegetativas e reprodutivas. B. Aspecto geral da folha, face adaxial (ad) e abaxial (ab). C. Vista frontal da face abaxial, mostrando tricomas tectores ramificados (tr), cutícula estriada (ct) e estômato (st) (Microscopia eletrônica de varredura - MEV). D. Vista frontal da face abaxial, evidenciando estômato (st) e cutícula estriada (ct) (MEV). Barra = 2cm (A), 0,5cm (B).

O sistema de revestimento de folhas, caules e estruturas reprodutivas de Lamiaceae tem importância taxonômica, especialmente os tricomas, pois a morfologia, distribuição e frequência podem ser usadas para diferenciar as várias subfamílias (RIVA *et al.*, 2014; RUSYDI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2012; CELEP *et al.*, 2011; SALMAKI *et al.*, 2011; MARIN *et al.*, 2010; KAHRAMAN *et al.*, 2010; DINÇ & ÖZTÜRK, 2008; HARLEY *et al.*, 2004; HANLIDOU *et al.*, 1991; HEINRICH *et al.*, 1983). Dentro desse contexto, destacam-se os tricomas glandulares, que nessa família mostram-se peltados e capitados (LIU *et al.*, 2012; CELEP *et al.*, 2011; MARIN *et al.*, 2010; ZUZARTE *et al.*, 2009; IRITI *et al.*, 2006; RAPISARDA *et al.*, 2001).

Lavandula dentata apresenta três tipos distintos de tricomas, dois glandulares e um tector, bem como outros membros de Lamiaceae (GRUJIĆ *et al.*, 2014; RUSYDI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2012; KAHRAMAN *et al.*, 2010) e de *Lavandula*, a exemplo de *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. e *Lavandula angustifolia* Mill. (RIVA *et al.*, 2014).

O tricoma tector é pluricelular e ramificado (Figuras 7C; 8A, B e C; 9A e C), assim como os encontrados em *Lavandula latifolia* Medik., *Lavandula luisieri* (Rozeira) Rivas Mart., *Lavandula multifida* L. e *Lavandula pedunculata* (Mill.) Cav. *Lavandula pedunculata* e *L. multifida* apresentaram tricomas bifurcados e ramificados mistos (ZUZARTE *et al.*, 2010; ZUZARTE *et al.*, 2009; ZUZARTE *et al.*, 2008). Diferentemente da constatação geral, *Lavandula viridis* L'Hér. não apresentou tricoma tectores (ZUZARTE *et al.*, 2009). Esses anexos epidérmicos têm a função de proteger a planta contra a perda de água, atuar na regulação da temperatura através da sua capacidade reflexiva e na proteção mecânica contra herbívoros, além de proteger os tricomas glandulares (LIU *et al.*, 2012).

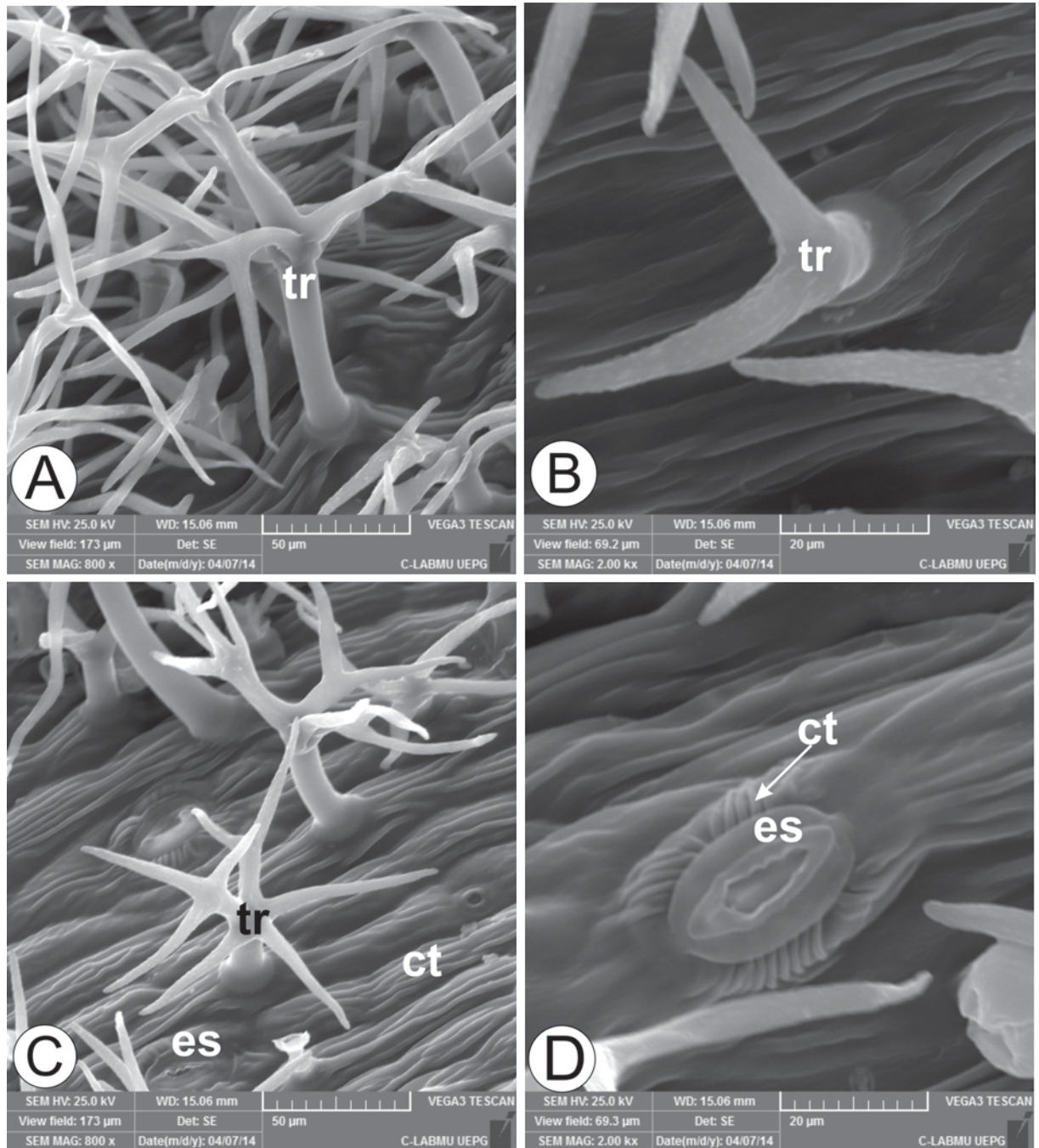


FIGURA 8. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae – Vista frontal da face abaxial (MEV). A. Tricoma tector ramificado (tr). B. Tricoma tector ramificado (tr). C. Tricoma tector ramificado (tr), cutícula estriada (ct) e estômato (es). D. Estômato (es) e cutícula estriada (ct).

Nesse estudo, *L. dentata* apresenta tricomas glandulares capitados (Figura 9B, 10B, C, E e F) e peltados (Figuras 9D e 10D). Os primeiros mostram-se formados por uma célula basal com pedicelo curto formado por 1-3 células e cabeça uni ou bicelular globosa. Esses tricomas foram amplamente relatados em espécies de Lamiaceae (RUSYDI *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2010) e em *Lavandula* spp. (ZUZARTE *et al.*, 2010; ZUZARTE *et al.*, 2009; ZUZARTE *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2008; IRITI *et*

al., 2006). Dentre a família, aparecem pedicelos uni ou pluricelulares, a exemplo de *Salvia* spp. com até 5 células, e cabeças unicelulares ou raramente bicelular como *Melissa officinalis* L. e *Salvia* spp. Os tricomas mais comuns são aqueles com pedicelos e cabeças unicelulares. Além de *Calamintha menthifolia* Host, tricomas com 3 células também estão presentes nas folhas de *Coridothymus capitatus* (L.) Rchb.f., *Majorana syriaca* (L.) Raf., *Micromeria fruticosa* (L.) Druce, *Satureja thymbra* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia sclarea* L., *Salvia dominica* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha piperita* L. e *Mentha viridis* (L.) L. Pêlos glandulares com pedicelo bicelular e cabeças alongadas unicelulares, têm sido encontrados nas folhas de *Majorana syriaca*, *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* L. (HANLIDOU *et al.*, 1991).

Os tricomas peltados de *L. dentata* são formados por uma única célula basal, por pedicelo curto e cabeça pluricelular arredondada. Observação semelhante foi verificada nos trabalhos de Duarte & Souza (2014) e Riva (2014). Alguns autores salientaram que os tricomas peltados de Lamiaceae são formados por uma cabeça larga contendo até 16 células (CELEP *et al.*, 2014; RUSYDI *et al.*, 2013; CELEP *et al.*, 2011; KAHRAMAN *et al.*, 2010; HALLAHAN, 2000), podem variar de 8 em *Mentha piperita* para 18 em *Micromeria fruticosa*. O tipo encontrado em *Calamintha menthifolia*, com 12 células e pedicelo unicelular parece ser o tipo mais comum. Também é descrito para *Majorana syriaca*, *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Salvia fruticosa* e *Satureja thymbra* (HANLIDOU *et al.*, 1991).

Os tricomas glandulares, que comumente contêm óleos voláteis, estão amplamente distribuídos no reino vegetal, especialmente em algumas famílias como Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae, Apiaceae e outras (BUDEL *et al.*, 2012; FARAGO *et al.*, 2005; LAVABRE, 1997).

Os óleos voláteis atuam como sinais de comunicação química com os vegetais e como armas de defesa química contra os animais. Independentemente de sua composição química, os óleos voláteis são compartimentalizados em estruturas anatômicas que evoluíram de células oleíferas, cavidades e dutos secretores a tricomas glandulares (GOTTLIEB & SALATINO, 1987).

O óleo volátil presente nos tricomas glandulares de *L. dentata* fica armazenado no espaço subcuticular e, este, reagiu à pesquisa com Sudam III, como observado no trabalho de Giuliane e Bini (2008) para as espécies de Lamiaceae, a exemplo de

Stachys officinalis subsp. *haussknechtii* (Nyman) Greuter & Burdet, *Stachys alopecuros* (L.) Benth., *Stachys annua* (L.) L. e *Scutellaria galericulata* L.

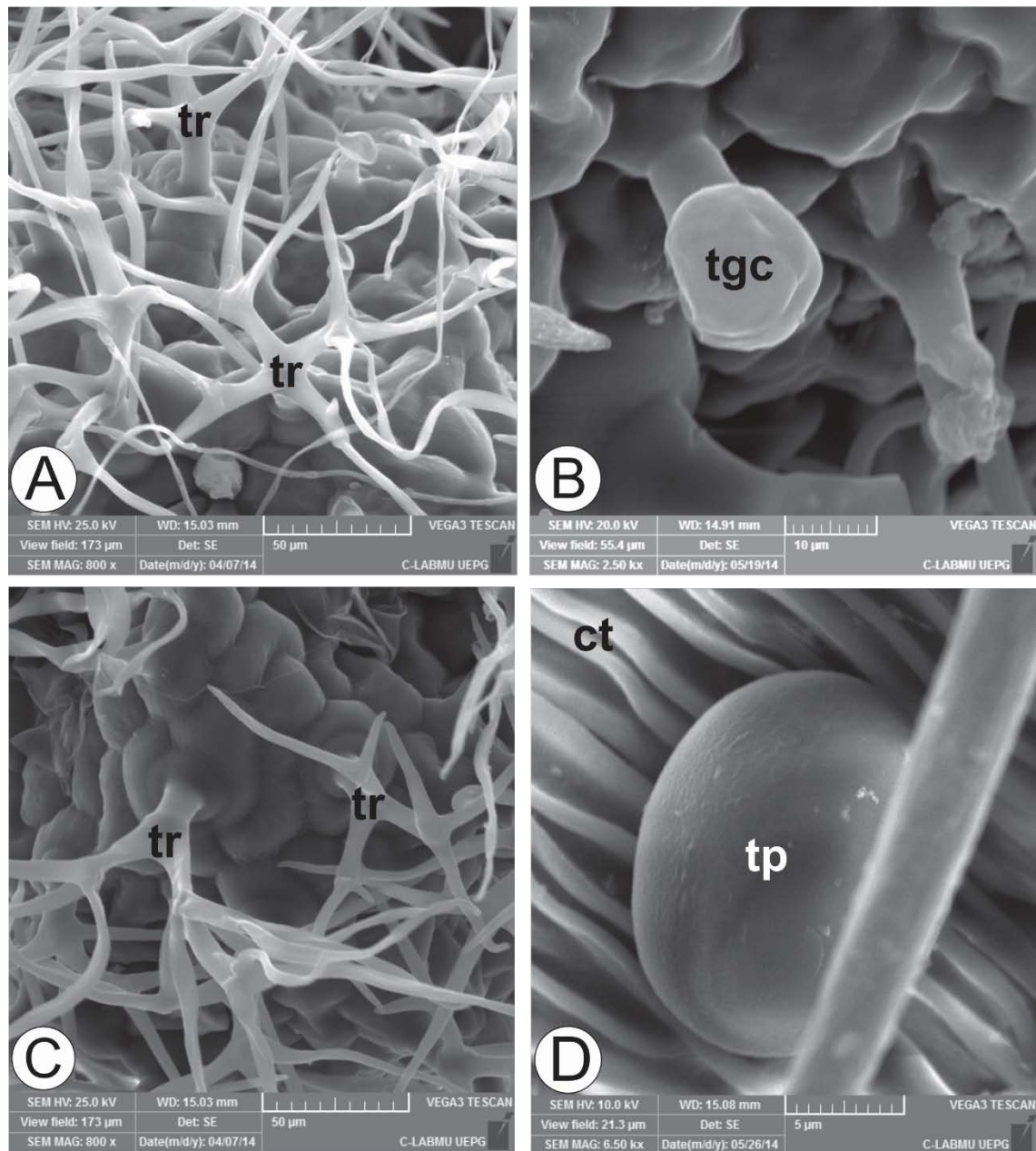


FIGURA 9. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae. Vista frontal da face adaxial (MEV). A. Tricomas tectores ramificados (tr). B. Tricoma glandular capitado (tgc). C. Tricomas tectores ramificados (tr). D. Cutícula estriada (ct) e tricoma glandular peltado (tp).

A lâmina foliar de *L. dentata*, em secção transversal, apresenta mesofilo dorsiventral, formado por 1-2 camadas de parênquima paliçádico e 3-4 camadas de parênquima esponjoso (Figura 10F). O tipo de parênquima e a variação no número de camadas que compõe o mesofilo podem ser importantes para a classificação das espécies dentro dos taxa (SALMAKI *et al.*, 2011). Este tipo de mesofilo permite

revelar que a espécie requer grande quantidade de umidade no solo e atmosfera relativamente úmida (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELLO-GUERREIRO, 2006). No interior do parênquima esponjoso ocorrem feixes vasculares colaterais de pequeno porte que estão recobertos por uma bainha que controla a entrada e saída de substâncias (RAVEN *et al.*, 2007).

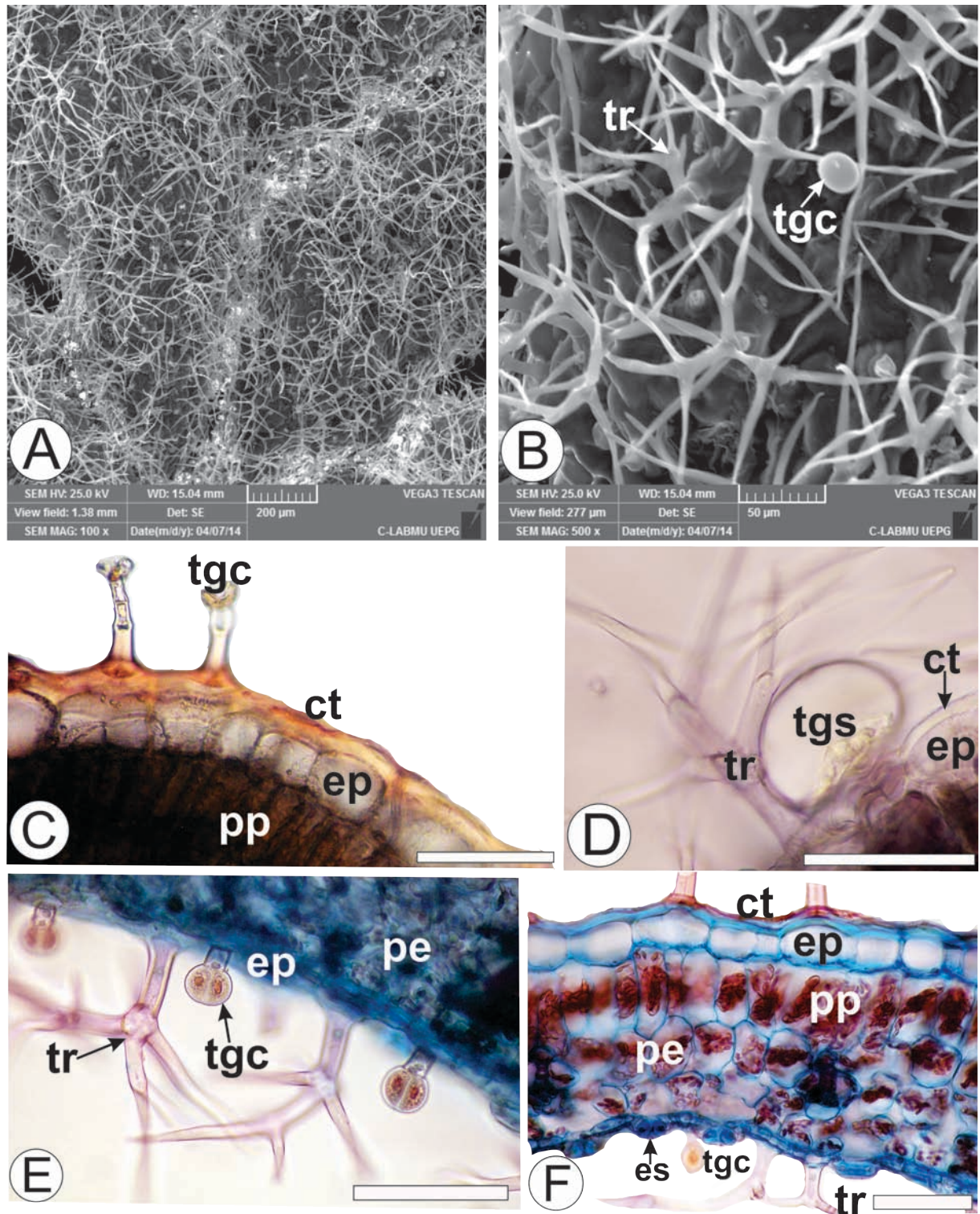


FIGURA 10. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae – folha. A. Vista geral da superfície abaxial do limbo foliar apresentando grande número de tricomas (MEV). B. Detalhe da figura anterior, mostrando tricoma tector ramificado (tr) e tricoma glandular capitado (tgc) (MEV). C. Secção transversal da lâmina foliar, evidenciando epiderme (ep) com cutícula (ct) em reação com Sudam III e tricoma glandular capitado (tgc) e parênquima paliádico (pp). D. Epiderme (ep) foliar em secção transversal, apresentando cutícula (ct), tricoma glandular peltado (tp) e tricoma tector ramificado (tr). E. Secção transversal do limbo foliar, evidenciando epiderme (ep), parênquima esponjoso (pe), tricoma glandular capitado (tc) e tricoma tector ramificado (tr) na face abaxial. F. Secção transversal do mesófilo, mostrando cutícula (ct), epiderme (ep), parênquima paliádico (pp), parênquima esponjoso (pe), estômato (es), tricoma glandular capitado (tgc) e tricoma tector ramificado (tr). Barra = 50µm (C, D, E, F).

A nervura central, seccionada transversalmente, tem formato levemente côncavo-convexo, sendo truncada na face abaxial (Figura 11A). O formato da secção transversal da nervura central tem importância taxonômica, pois auxilia na identificação e diferenciação de espécies vegetais (WOSCH *et al.*, 2015; BARRETO *et al.*, 2015). Nesse sentido, diferentemente da espécie em estudo, *Lavandula angustifolia* Mill. mostrou convexidade aguda na face abaxial da nervura central (RIVA *et al.*, 2014).

A epiderme é uniestratificada, coberta por cutícula estriada e evidencia tricomas similares aos descritos para a lâmina (Figuras 11A e B). Subjacentemente, ocorre 1-2 camadas de colênquima angular em ambas as faces (Figura 11C). Mergulhado no parênquima fundamental, observa-se um feixe vascular colateral central (Figuras 11A e D) cercado por uma bainha parenquimática (Figura 11D). Esta é uma característica comum em Lamiaceae (SALMAKI *et al.*, 2011).

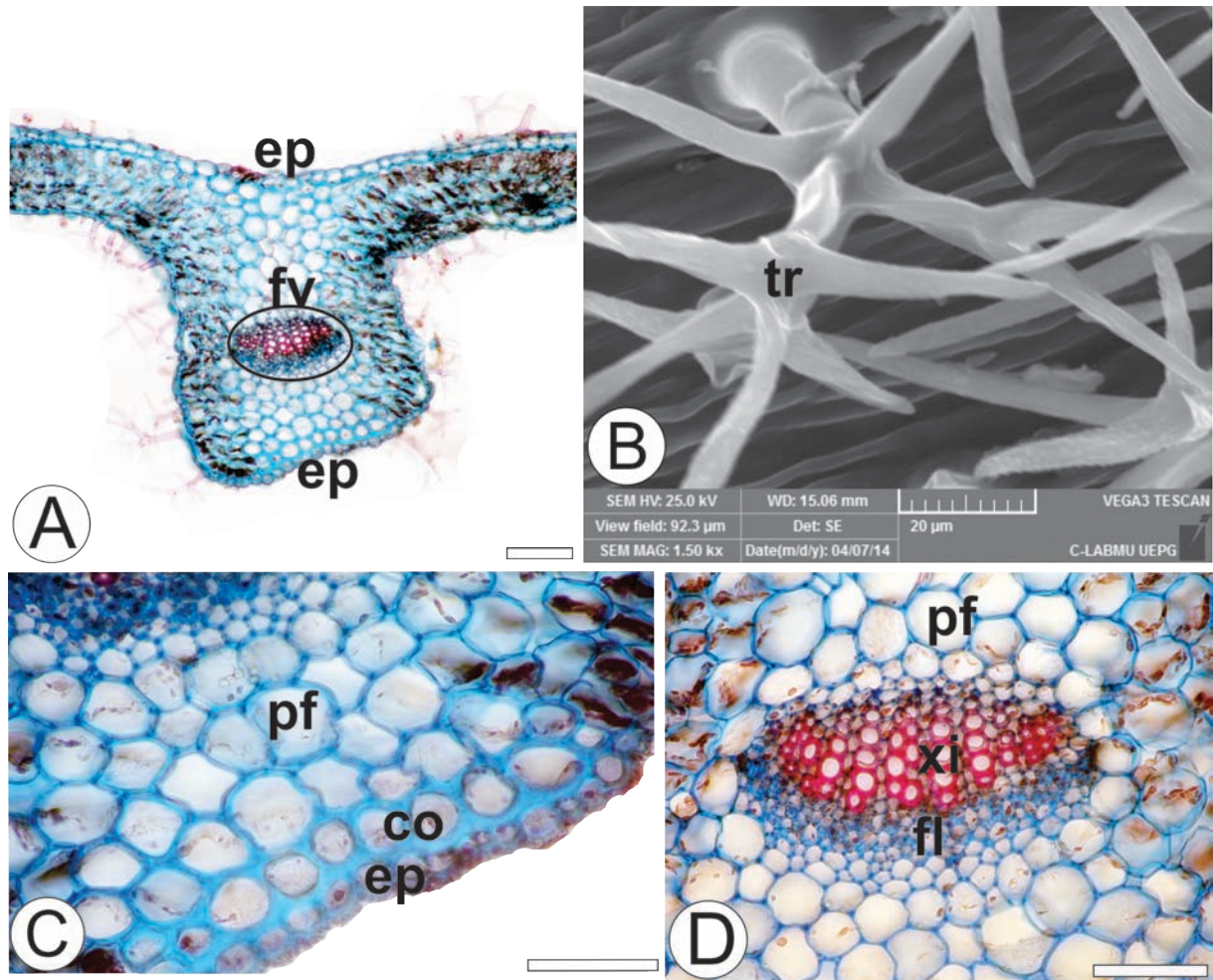


FIGURA 11. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae – nervura central. A. Secção transversal evidenciando forma levemente côncava-convexa. B. Vista frontal da face adaxial, mostrando tricoma tector ramificado (tr) (MEV). C. Secção transversal da face abaxial, indicando epiderme (ep), colênquima (co) e parênquima fundamental (pf). D. Detalhe do feixe vascular da nervura central, mostrando parênquima fundamental (pf), xilema (xi) e floema (fl). Barra = 200µ (A), 50µm (C, D).

O caule, em secção transversal, apresenta formato quadrangular (Figura 12A e B). O sistema de revestimento mostra epiderme coberta por cutícula espessa e estriada (Figura 12E) e inúmeros tricomas semelhantes aos descritos para o limbo foliar com maior frequência dos tectores ramificados (Figura 12B e C). Internamente à epiderme, ocorre colênquima angular alternado com parênquima cortical. Limitando internamente o córtex, aparece a endoderme. Calotas esclerenquimáticas são observadas, entretanto, bem desenvolvidas nas quatro arestas (Figura 12A), estas reagiram positivamente à pesquisa de lignina. O sistema vascular é típico, sendo o floema localizado externamente e o xilema internamente (Figura 12E). A medula é formada por células parenquimáticas delgadas e não lignificadas (Figura 12D). Essas características são comuns na maioria das espécies de Lamiaceae (RUITERS *et al.*, 2015; DUARTE & SOUZA, 2014; GRUJIĆ *et al.*, 2014; CELEP *et al.*, 2011;

BAGHERPOUR *et al.*, 2010; KAHRAMAN *et al.*, 2010; ÖZDEMİR *et al.*, 2009; DINÇ & ÖZTÜRK, 2008).

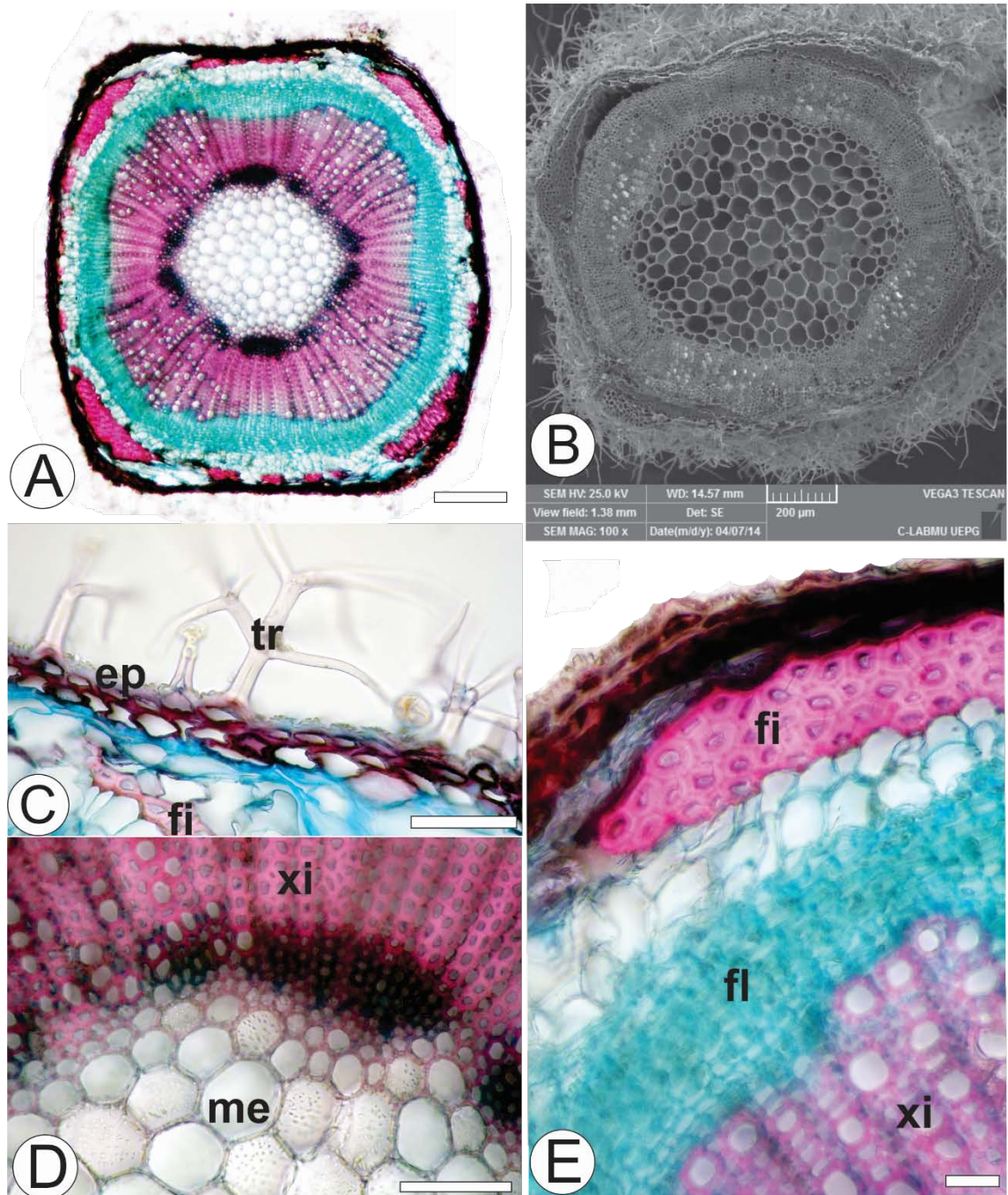


FIGURA 12. *Lavandula dentata* L. – Lamiaceae – caule. Visão geral da secção transversal. B. Secção transversal em MEV. C. Secção transversal, mostrando epiderme (ep), fibras esclerenquimáticas (fi), tricomas tectores ramificados (tr). D. Detalhe do xilema (xi) e da medula (me). E. Detalhe da calota de fibras esclerenquimáticas (fi), floema (fl) e xilema (xi). Barra = 200µm (A), 50µm (C, D, E).

5.2. ANÁLISE DO ÓLEO VOLÁTIL POR CG-EM

Durante o processo de extração das partes aéreas de *L. dentata* L. por meio do aparato de Clevenger, foi observado que o óleo volátil extraído possui uma densidade menor do que a densidade da água, coloração amarelo claro e odor característico. O teor calculado pela média de 15 extrações realizadas foi de 0,85%. Geralmente, quando realizada a extração das partes vegetativas aéreas, a concentração de óleo obtida é baixa, inferior a 1% (BRUNETON, 1991).

Os tricomas glandulares peltados são responsáveis por produzir a maior parte deste óleo essencial, principalmente, monoterpenos e sesquiterpenos. Já os tricomas capitados normalmente secretam pouca quantidade de óleo essencial e secretam quantidades variáveis de polissacarídeos (TURNER *et al.*, 2000; CLARK *et al.*, 1997; FIGUEIREDO *et al.*, 1995; WERKER, 1993).

O componente mais encontrado nos óleos voláteis são os terpenos, sendo eles representados por misturas complexas de terpenos, terpenos oxigenados, monoterpenos (C10) ou sesquiterpenos (C15). Além destes, pode apresentar pequenas quantidades de diterpenos, fenilpropanoides, acrescidos de moléculas menores, como alcoois, aldeídos, cetonas de cadeias curtas e o perfil terpênico, podendo apresentar substâncias constituídas de moléculas de dez e quinze carbonos e outros componentes em função da planta aromática (CASTRO *et al.*, 2004; SERAFINI *et al.*, 2001; SIANI, 2000; LANÇAS & CAVICHIOLI, 1990).

Os principais compostos identificados, comparando o índice de retenção teórico com o calculado, para o óleo volátil das partes aéreas de *L. dentata* estão descritos na tabela abaixo.

TABELA 1. Composição química do óleo volátil de *L. dentata* L. obtido por CG-MS.

Constituinte	Peso molecular (g/mol)	Índice de retenção calculado	Índice de retenção teórico	Concentração (%)
Isolimoneno¹	136,2340	980	980	6,96
1,8 – cineol¹	154,249	1034	1026	63,25
Linalol¹	154,25	1100	1095	3,70
Trans – pinocarveol¹	152,23	1142	1135	5,65
Trans- verbenol¹	152,2334	1150	1140	2,69
Ment-3-en-8-ol¹	154,25	1154	1145	3,95
Thuj-3-en-10-al¹	150,2176	1175	1181	6,53
14-hidroxi-4,5-dihidro cariofileno²	222,3663	1710	1706	1,72

¹ Monoterpeno.² Sesquiterpeno.

Os resultados relativos à constituição química do óleo volátil em estudo, apresentam uma porcentagem de 92,72% de monoterpenos, com 1,8-cineol como componente majoritário e 1,72% de sesquiterpenos (14-hidroxi-4,5-dihidro cariofileno). Estes resultados são condizentes com o verificado na literatura assim como Simões e Spitzer (2007), que afirmam que em 90% dos óleos voláteis há predomínio de monoterpenos. Em sua maior composição apresentam-se monoterpenos oxigenados e hidrocarbonados, assim como Chhetri *et al.* (2015), Masetto *et al.* (2011) e Imelouane *et al.* (2009). Neste último trabalho, o 1,8-cineol foi o componente majoritário com 41,28%. As espécies de *L. dentata* avaliadas, do Marrocos e da Tunísia, apresentaram altas concentrações de 1,8-cineol, 41,3 e 33,5% respectivamente (CHHETRI *et al.*, 2015). Em 2010, Imelouane *et al.*, realizaram coletas de *L. dentata* L. em Taforalt, Talazart no oriente do Marrocos e obtiveram quantidades diferentes deste monoterpeno oxigenado, apenas 5,53% nas partes aéreas. O componente majoritário encontrado foi o beta-pineno com 27,08%. Além do estágio de desenvolvimento, a época de colheita afeta o teor e composição do óleo volátil, assim como outras variáveis (MASETTO *et al.*, 2011).

Lavandula x alardii, uma espécie híbrida (*L. dentata* x *L. latifolia*), apresentou aproximadamente 60% de 1,8-cineol em sua composição quando analisada por Bruni *et al.* em 2006, assim como *L. luisieri* (76,68%) quando analisada por Sanz *et al.* em

2004. *L. angustifolia* também apresentou um alto teor de monoterpenos oxigenados, porém os seus componentes majoritários são o linalol e o acetato de linalilo, assim como *L. x intermedia* e *L. vera* (SANTANA *et al.*, 2012; HUSSAIN *et al.*, 2011; BRUNI *et al.*, 2006). *Lavandula latifolia* apresenta o mesmo perfil, porém as substâncias em maior quantidade são o linalol e a cânfora (SANTANA *et al.*, 2012). *Lavandula stoechas* apresentou a fenchona e a cânfora como componentes majoritários (GIRAY *et al.*, 2008).

Também conhecido como cineol, eucaliptol ou 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo [2.2.2] octano, o 1,8-cineol apresenta atividades antimicrobiana, expectorantes, gastroprotetora, anti-inflamatórias, anestésica, antisséptica, repelente, nematocida, antiespasmódica, entre outras. Além destas atividades, possui um caráter não-reativo e não tóxico (MASETTO *et al.*, 2011; SIMÕES & SPITZER, 2007; VINCENZI *et al.*, 2002).

5.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.3.1. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

O óleo volátil foi testado frente a diferentes espécies para avaliar seu potencial antimicrobiano. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 2.

TABELA 2. Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e concentração bactericida mínima (CBM) do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. após 24 horas de tratamento. Resultados obtidos em triplicata.

Espécie	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Candida albicans</i>
CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	54,7	54,7	437,5	54,7	54,7
CBM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	218,8	54,7	-	54,7	54,7

Quando submetidas ao tratamento com o óleo volátil de *L. dentata* todas as espécies bacterianas sofreram influências em sua proliferação. Para *Staphylococcus*

aureus, a concentração inibitória mínima (CIM) foi de $54,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$, assim como para *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*. Para estas espécies, este valor ($54,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi também encontrado para a concentração bactericida mínima (CBM). Para *Escherichia coli* o valor da CBM foi mais alto, $218,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* foi a que apresentou menor sensibilidade ao tratamento. Sendo assim, não apresentou uma concentração bactericida, porém ainda assim o tratamento com o óleo volátil de *L. dentata* conseguiu inibir o seu crescimento com uma concentração de $437,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em 2014, Benbelaid *et al.* testou o óleo volátil de *L. dentata* contra duas cepas de *E. faecalis* (ATCC 29212 e ATCC 49452) e apresentou uma concentração inibitória mínima de $1.000 \pm 0,000$ e $0,833 \pm 0,288\%$ v/v, respectivamente. Foi testada a atividade do óleo volátil de *L. pedunculata* contra *Candida albicans* ATCC10231 por Zuzarte *et al.* (2009). A concentração inibitória mínima encontrada foi de $2,5 \mu\text{l/mL}$ e uma média de $2,9 \mu\text{l/mL}$ para a concentração bactericida mínima de três amostras de diferentes localidades.

O extrato etanólico e aquoso de *Lavandula stoechas* L. ($2000 \mu\text{g/mL}$) apresentou efeito sobre *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella typhi* (YAZDI *et al.*, 2014). O óleo volátil de *L. angustifolia* apresentou efeito antimicrobiano com $4,0-9,0 \text{ mg/mL}$. Ou seja, as plantas que compõe *Lavandula* apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, especialmente o seu efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano, incluindo *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *E. coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* (PRUSINOWSKA & ŚMIGIELSKI, 2014). Contudo, quando comparado com a literatura citada, os resultados obtidos neste trabalho com o óleo de *L. dentata* revelam um maior potencial antimicrobiano.

5.4. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

5.4.1. MÉTODO DA REDUÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH•

A Tabela 3 apresenta a capacidade antioxidante estabelecida pelo método de redução do radical livre DPPH•, a partir de diferentes concentrações do óleo volátil de *L. dentata*.

TABELA 3. Porcentagem de capacidade antioxidante pelo método do DPPH• em diferentes concentrações no tempo 30 minutos. Resultados obtidos em triplicata.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	20	15	10	5
Óleo volátil	$5,7 \pm 1,4\%$	$5,2 \pm 0,3\%$	$1,8 \pm 1,8\%$	$0,7 \pm 0,7\%$
Ácido gálico	$96,7 \pm 1,0\%$	$96,7 \pm 0,8\%$	$96,4 \pm 0,3\%$	$95,8 \pm 0,2\%$
Rutina	$97,9 \pm 0,7\%$	$97,5 \pm 0,6\%$	$97,5 \pm 0,6\%$	$96,5 \pm 1,2\%$

A maior atividade antioxidante obtida pelo método do DPPH•, quando avaliado o óleo volátil, foi com a maior concentração testada ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentando $5,7 \pm 1,4\%$ de atividade. Estes resultados podem ser comparados aos obtidos por MOTHANA *et al.*, que em 2012 realizou o teste com a mesma espécie coletada no distrito de Ibb (Yemen) e obteve também uma leve atividade antioxidante pelo DPPH•. A concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após 30 minutos de incubação apresentou 1,7% de atividade, ou seja, aproximadamente o mesmo valor obtido nos testes realizados (1,8%). Também foi realizada uma avaliação de extratos metanólicos e aquoso nesta mesma concentração, que apresentaram 9,8% e 2,2% de atividade antioxidante respectivamente (MOTHANA *et al.*, 2009).

Comparando estes dois trabalhos com os resultados obtidos, pode-se perceber o fraco potencial antioxidante dessa espécie. Quando avaliada por Sariri *et al.* (2009), *L. dentata* apresentou um IC₅₀ de $48,7 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$ para o extrato aquoso. Esta variação de atividade demonstra que a capacidade antioxidante de um óleo volátil pode variar com a época de coleta, habitat, fatores ambientais como disponibilidade de água, nutrientes do solo, clima do local, biota associada, entre outros (GONÇALVES & ROMANO, 2013; MASETTO *et al.*, 2011; IMELOUANE *et al.*, 2009; UPSON *et al.*, 2000).

5.4.2. MÉTODO DE REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos com o teste de redução do complexo fosfomolibdênico. O ácido ascórbico apresenta atividade antioxidante de 100%, pois é a substância de referência conforme preconizado na literatura

(PRIETTO; PINEDA; AGUILAR, 1999). A atividade antioxidante relativa (%AAR) do óleo volátil de *L. dentata* foi igual em relação aos padrões rutina e ácido gálico.

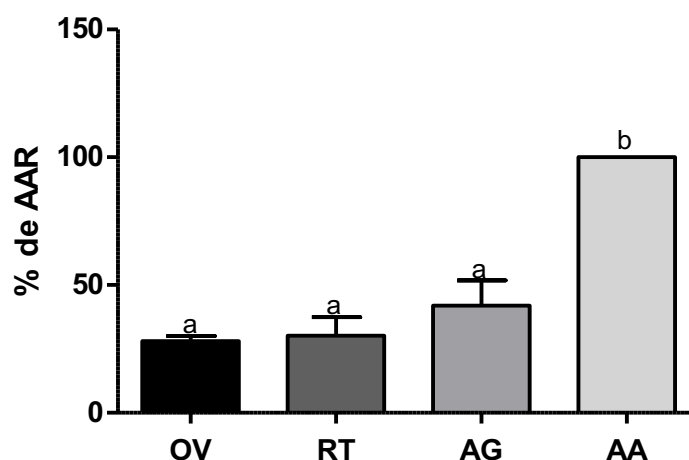


FIGURA 13. Média da atividade antioxidante relativa (%AAR) ao ácido ascórbico (AA) do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico. A barra de erro representa o desvio padrão da atividade antioxidante, obtidos a partir de dois ensaios independentes, efetuados em triplicata. Letras diferentes representam diferença significativa obtida por análise de ANOVA, seguida pelo teste *post-hoc* de TUKEY ($p < 0,05$). OV: óleo volátil; RT: rutina; AG: ácido gálico; AA: ácido ascórbico.

O óleo volátil de *L. dentata* apresentou uma fraca capacidade de reduzir o complexo fosfomolibdênico com $28,11 \pm 1,95\%$ de AAR, de acordo com a Figura 13 apresentada. Pode-se observar que a porcentagem obtida para o referido óleo é inferior e estatisticamente diferente quando comparada com a substância de referência, o ácido ascórbico. Entretanto, esse ensaio não apresentou diferença significativa com os padrões rutina e ácido gálico, utilizados e reconhecidos pelo grande potencial antioxidante.

5.4.3. MÉTODO DE DESCOLORAÇÃO DO RADICAL ABTS $\cdot^+$

Os resultados do teste de descoloração do radical ABTS $\cdot^+$ para diferentes concentrações do óleo volátil de *L. dentata* estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. Porcentagem de atividade antioxidante de diferentes concentrações do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. pelo método de descoloração do radical catiônico ABTS^{•+}. Resultados obtidos em triplicata.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	20	15	10	5	2,5	1,25
Óleo volátil	$22,0 \pm 0,6\%$	$16,3 \pm 0,1\%$	$13,8 \pm 2,0\%$	$9,1 \pm 4,0\%$	$5,3 \pm 2,2\%$	$4,4 \pm 3,6\%$
Ácido gálico	$100,0 \pm 0,4\%$	$100,0 \pm 0,6\%$	$100,0 \pm 0,5\%$	$100,0 \pm 0,5\%$	$99,8 \pm 0,7\%$	$99,8 \pm 0,3\%$
Rutina	$99,3 \pm 0,0\%$	$99,0 \pm 0,1\%$	$98,5 \pm 0,2\%$	$93,9 \pm 1,5\%$	$51,0 \pm 3,5\%$	$32,8 \pm 0,6\%$

Para as diluições realizadas foi possível observar uma leve capacidade antioxidante do óleo volátil de *L. dentata*. A maior concentração testada ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou $22,0 \pm 0,6\%$ de atividade antioxidante e a menor concentração ($1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou $4,4 \pm 3,6\%$, aproximadamente. O ácido gálico e a rutina, utilizados como padrões, confirmaram o grande poder antioxidante descrito anteriormente, chegando a aproximadamente $100,0 \pm 0,4\%$ e $99,3$ de atividade, respectivamente.

Alguns trabalhos demonstraram que o óleo volátil de outras espécies de *Lavandula* possuem um grande potencial antioxidante, como *L. stoechas* (CHERRAT *et al.*, 2013), *L. stoechas* subsp. *luisieri* (BAPTISTA *et al.*, 2015), *L. angustifolia* (HAMAD *et al.*, 2013; HUSSAIN *et al.*, 2011), *L. officinalis* (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2011) e *L. pedunculata* (BAPTISTA *et al.*, 2015).

O fraco potencial antioxidante apresentado por *L. dentata* pode ser explicado pelo fato de seu óleo volátil apresentar muitos compostos insaturados e poucos componentes aromáticos com mais de uma hidroxila, assim como a maioria dos óleos. Além disso, o radical livre DPPH[•] não apresenta capacidade redox suficiente para ser reduzido por compostos com poucas hidroxilas. Já com o ensaio de redução do complexo fosfomolibdênico o óleo apresenta um valor considerável de atividade antioxidante relativa, quando comparado com os padrões. Sabe-se que este complexo decorre de reações do tipo redox e pode ser facilmente reduzido por substâncias insaturadas presentes no óleo de *L. dentata* (BOSCARDIN, 2009; SIMÕES & SPITZER, 2007; BLOIS, 1958).

5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO ÓLEO VOLÁTIL SOBRE CÉLULAS CALU-3

O efeito da fase líquida do óleo volátil de *L. dentata* sobre a viabilidade celular da linhagem Calu-3 avaliado pelo ensaio de redução do MTT (Figura 14A) e da sulfarodamina B (Figura 14B) está representado na Figura 14. A fase líquida do óleo volátil gerou uma redução da viabilidade celular de 79,0% e de 40,9% nas maiores concentrações, 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, testadas pelo ensaio do MTT e da SRB, respectivamente, as quais não diferem entre si estatisticamente.

Utilizando os resultados de viabilidade celular obtidos por meio do ensaio de redução do MTT, foi calculado o valor de IC₅₀ da fase líquida do óleo volátil correspondente a 388,84 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, considerando-se o período de tratamento de 72 horas. Entretanto, o valor encontrado não se mostra expressivo quando comparado a outros óleos já testados, a exemplo do óleo essencial da *Mentha x villosa* Hudson que apresentou atividade citotóxica em diversas linhagens de células testadas, com IC₅₀ variando entre 0,57 e 1,02 $\mu\text{g/mL}$ (AMARAL, 2014). Assim sendo, buscou-se avaliar a atividade da fase vapor do óleo volátil.

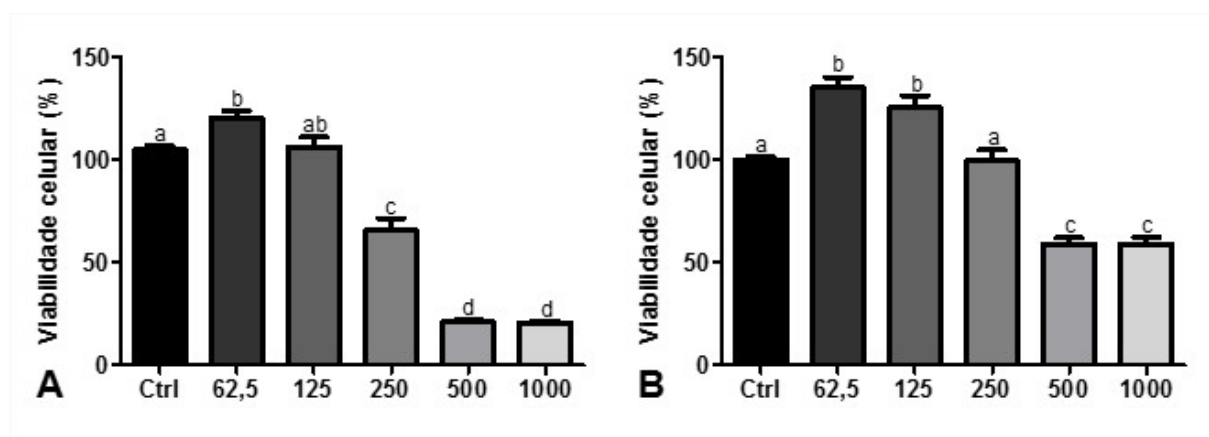


FIGURA 14. Efeito da fase líquida do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. em diferentes concentrações sobre células Calu-3.

Viabilidade celular (%) avaliada pelos ensaios do MTT (A) $n=34-48$ e SRB (B) $n=47-48$, após o tratamento de 72 horas com o óleo volátil nas concentrações de 62,5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O controle constitui-se de meio de cultivo e do veículo de solubilização do óleo (25% de propilenoglicol e 75% de etanol), conforme descrito anteriormente. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes. Letras diferentes representam diferença significativa obtida por análise de ANOVA, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ($p < 0,05$).

Baseando-se na literatura pode-se inferir que o efeito citotóxico do óleo volátil está relacionado à metabolização dos seus componentes, monoterpenos e sesquiterpenos, bem como do efeito sinérgico entre esses compostos. De fato, Oliveira *et al.* (2015) afirmam que os óleos voláteis, independente da origem vegetal, possuem maior atividade citotóxica do que os compostos isolados obtidos das

mesmas. Além disso, alguns trabalhos relatam que os componentes do óleo volátil possuem alta capacidade de penetração celular dado o seu caráter lipofílico (CAL, 2006; WILLIAMS & BARRY, 1989).

Em 2010, Imelouane *et al.* testaram o óleo de *L. dentata* em cinco linhagens de células cancerígenas e relataram os IC₅₀ (µg/mL) de cada uma. Para MCF-7 (câncer de mama) o IC₅₀ foi $101 \pm 4,402$ µg/mL, PC3 (próstata) foi de $59 \pm 8,083$ µg/mL, U-373 (fibroblastos) foi de $72 \pm 1,571$ µg/mL, V79 (fibroblastos) $73 \pm 1,528$ µg/mL, P388D1 (macrófago murino) foi maior que 600 µg/mL. Além disso, sabe-se que estes mesmos autores afirmaram que o óleo volátil também apresentou o 1,8-cineol como componente majoritário (41,28%). Ressalta-se ainda que estes valores de IC₅₀ foram obtidos através do tratamento com a fase líquida em contato com as células.

O efeito da fase vapor do óleo volátil das partes aéreas de *L. dentata* sobre a viabilidade celular da linhagem Calu-3, nas concentrações de 500, 750 e 1000 µg.mL⁻¹, está demonstrado na Figura 15.

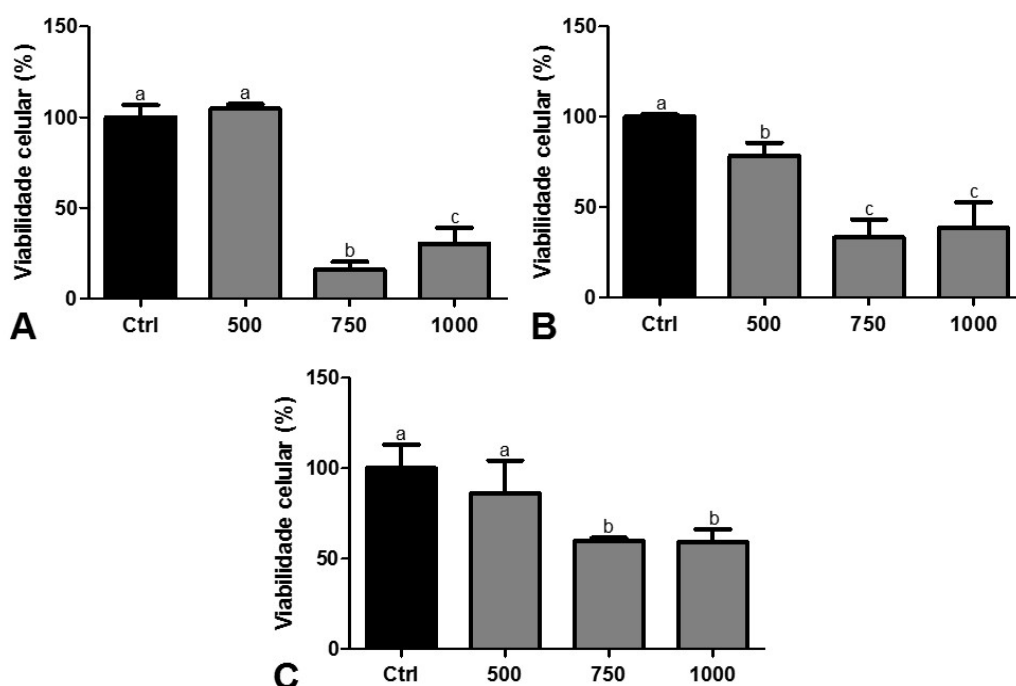


FIGURA 15. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. em diferentes concentrações sobre células Calu-3.

Viabilidade celular (%) avaliada pelos ensaios do MTT (A) n=7-14, SRB (B) n= 8-20 e DNA PI (C) n=8-12, após o tratamento de 72 horas com o óleo volátil nas concentrações de 500, 750, 1000 µg.mL⁻¹. O controle constitui-se do veículo de solubilização do óleo (25% de propilenoglicol e 75% de etanol). Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes. Letras diferentes representam diferença significativa obtida por análise de ANOVA, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY (p < 0,05).

O ensaio de redução do MTT (Figura 15A) mostrou que a fase vapor do óleo volátil nas concentrações de 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam uma ação citotóxica maior quando comparado com o grupo de células controle e as tratadas com uma concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$). Após 72 horas de incubação das células sob ação da fase vapor do óleo volátil, foram observadas as porcentagens de redução da viabilidade celular de 84,00% para a concentração de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 69,72% para a concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Comparando o controle com a concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não houve diferença estatística.

Com o objetivo de corroborar o efeito citotóxico do óleo volátil obtido pelo ensaio do MTT foram realizados ensaios com a SRB (Figura 15B). As concentrações de 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstram uma ação citotóxica similar ao observado para o ensaio de redução de MTT em comparação com o grupo de células controle ($p < 0,05$). Após 72 horas de incubação das células sob ação da fase vapor do óleo volátil, foram observadas as seguintes porcentagens de redução de viabilidade celular para as concentrações de 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$: 21,63%, 66,77% e 61,48%, respectivamente. As concentrações de 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ diferiram do controle e da concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), todavia não difeririam entre si.

A análise de determinação do conteúdo de DNA celular (Figura 15C), também corroborou os resultados obtidos por MTT e SRB. Os vapores do óleo volátil das concentrações de 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam atividade citotóxica estatisticamente diferente quando em comparação com o grupo controle e com 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$). As seguintes porcentagens de redução de viabilidade celular foram observadas: 40,22%, e 40,89% para as concentrações de 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ gerou uma redução de viabilidade celular de 13,84%.

Para avaliar o efeito do período de tempo de tratamento da fase vapor do óleo volátil sobre as células Calu-3, realizou-se o ensaio de redução do MTT com 24, 48 e 72 horas de exposição. Os efeitos do óleo volátil na concentração de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre a viabilidade celular da linhagem Calu-3, nos diferentes períodos de tempo, estão demonstrados na Figura 16.

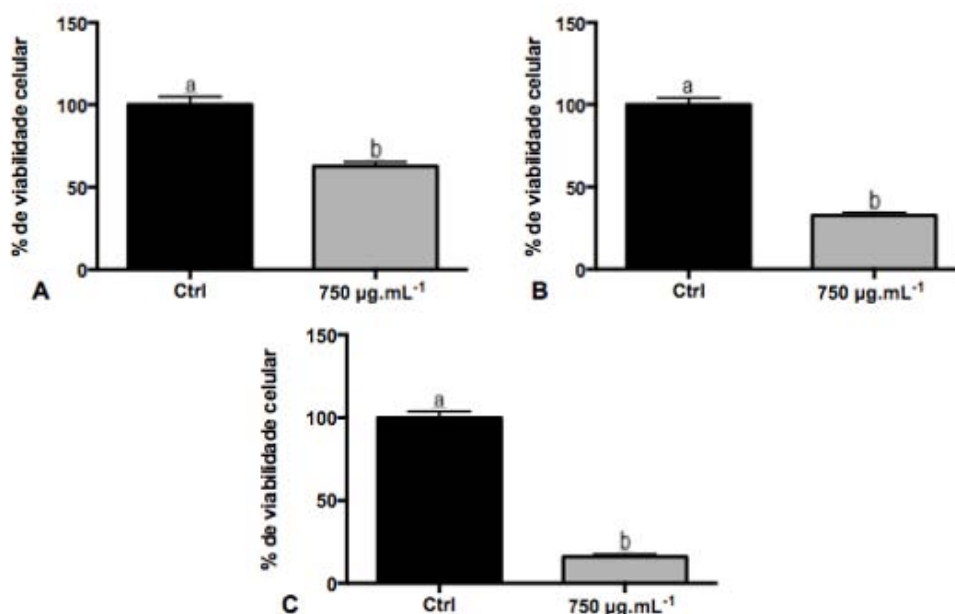


FIGURA 16. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre células Calu-3 em diferentes períodos de tratamento, sendo 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C).

Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio de redução do MTT (A) $n=6-12$, após o tratamento de 24, 48 e 72 horas com o óleo volátil na concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes. Letras diferentes representam diferença significativa obtida por análise de ANOVA, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ($p < 0,05$).

O óleo na concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular quando comparadas com as células controle. No tempo de exposição de 24 horas foi observada uma redução da viabilidade celular de 37,34%. Para os tempos de exposição de 48 e 72 horas, observou-se uma maior redução da viabilidade celular, respectivamente, 67,28% e 84,00%. Portanto a citotoxicidade do óleo volátil sobre a linhagem tumoral Calu-3 pode ser classificada como tempo dependente.

Aqui, pela primeira vez, foi mostrado que a fase vapor do óleo volátil de *L. dentata* é potencialmente eficaz para iniciar alterações metabólicas que conduzem à morte celular, considerando a atividade citotóxica revelada pelos ensaios do MTT, SRB e DNA - PI. Podemos, portanto, sugerir que o efeito citotóxico do óleo volátil está relacionado à metabolização dos seus componentes volatilizados a 37°C (fase vapor). Monoterpenos, que possuem baixo peso molecular, são mais voláteis quando comparado aos outros terpenos (JAKIEMIU, 2008), todavia, não é possível afirmar que seriam os responsáveis pelo efeito citotóxico.

A utilização da fase vapor de óleos voláteis para tratamento de câncer de pulmão apresenta como vantagem a praticidade, no entanto, o mecanismo de transporte das substâncias inaladas até o pulmão e seus efeitos ainda não foram elucidados. Relatos de efeitos biológicos da fase vapor de óleos voláteis são escassos na literatura. Selvarani e James (2013) relataram que o vapor das folhas de cedro *Thuja plicata* Donn ex D. Don foi capaz de inativar vírus causadores de viroses respiratórias, afirmando que o vapor não foi citotóxico para células pulmonares A549. O estudo de Seal *et al.* (2012) pode ser citado como um dos primeiros a relatar o efeito antitumoral da fase vapor em células de pulmão. Os pesquisadores relataram que o óleo volátil de semente de *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. induziu morte em células de câncer de pulmão (A549).

5.6. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E BUSCA PELO MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL EM CÉLULAS CALU-3

5.6.1. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA CELULAR POR MEIO DO EMPREGO DOS CORANTES: ROSENFELD (1947), ALARANJADO DE ACRIDINA COM BROMETO DE ETÍDIO (AO/BE) E HOESCHT 33342

As células Calu-3 coradas com o corante Rosenfeld após o tratamento com a fase vapor do óleo volátil na concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram observadas ao microscópio de luz e apresentaram perda parcial da adesão celular e redução do tamanho das colônias celulares devido, provavelmente à redução do número de células quando comparadas com o controle (imagem não mostrada).

As imagens das células tratadas com $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do óleo volátil e obtidas por microscopia de fluorescência com o emprego dos corantes AO/BE estão apresentadas na Figura 17 a 20-1 e 2 em diferentes aumentos. Conforme critérios de análise morfológica descritos no item 4.6.2.2. e em comparação com os controles positivos (Clorambucil e Vincristina), observa-se presença de células apoptóticas e necróticas, sendo estas últimas em uma maior proporção (Figura 18).

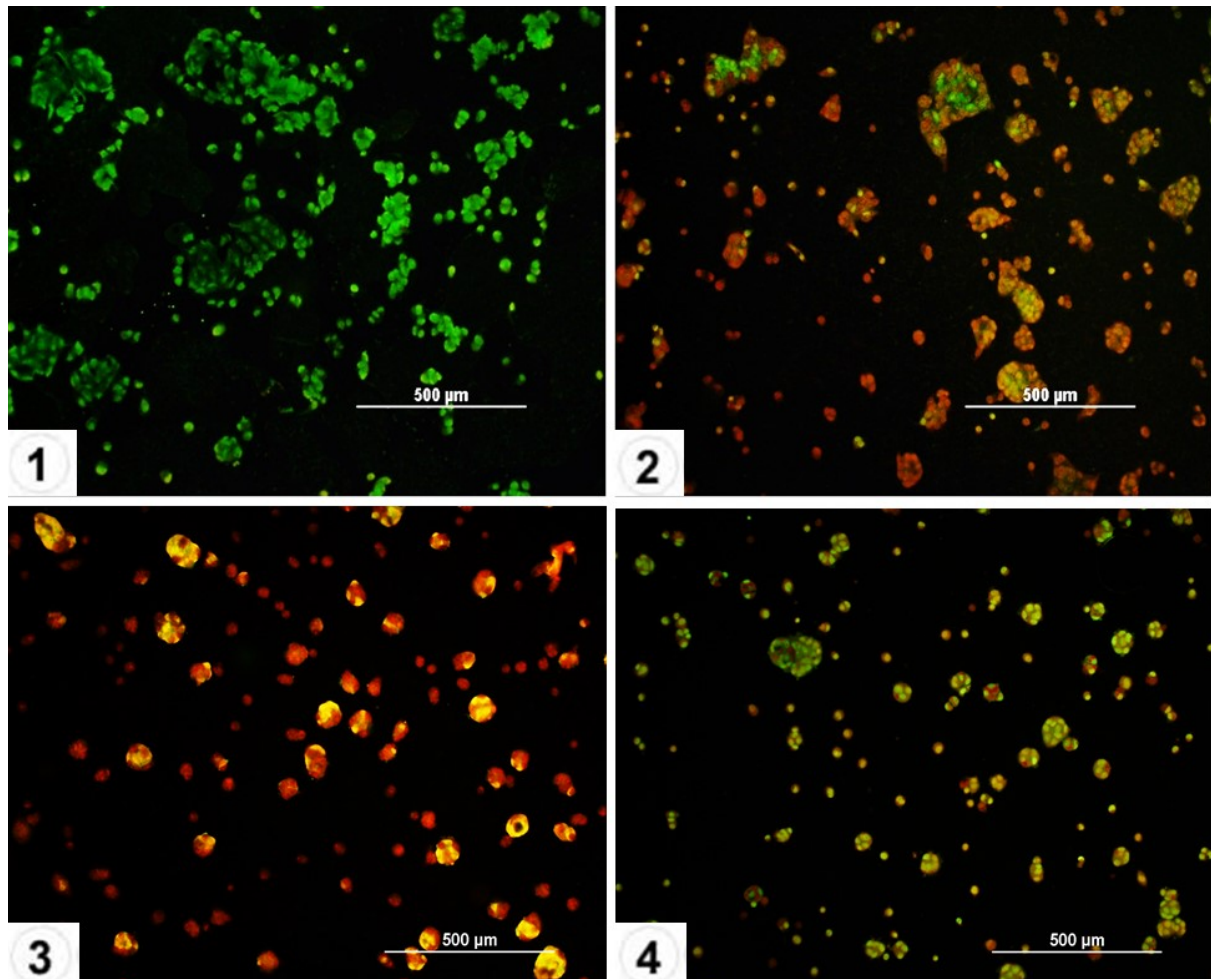


FIGURA 17. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina com brometo de etídio (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 100X).

O controle negativo (veículo) (1), as células tratadas por 24 horas com o óleo em uma concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (2) e os controles positivos clorambucil (3) e vincristina (4).

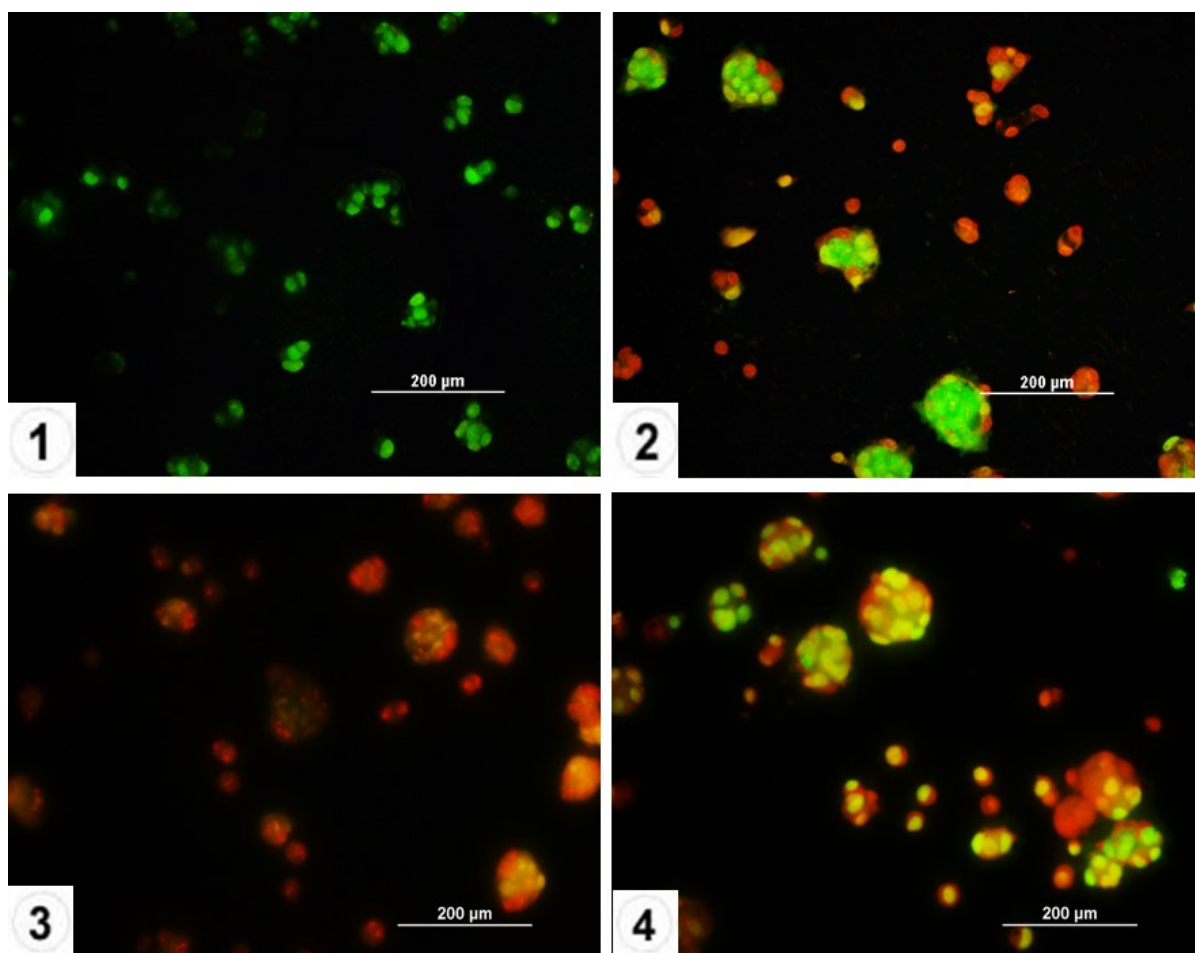


FIGURA 18. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina com brometo de etídio (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 200X).

O controle negativo (veículo) (1), as células tratadas por 24 horas com o óleo em uma concentração de 750 µg.mL⁻¹ (2) e os controles positivos clorambucil (3) e vincristina (4).

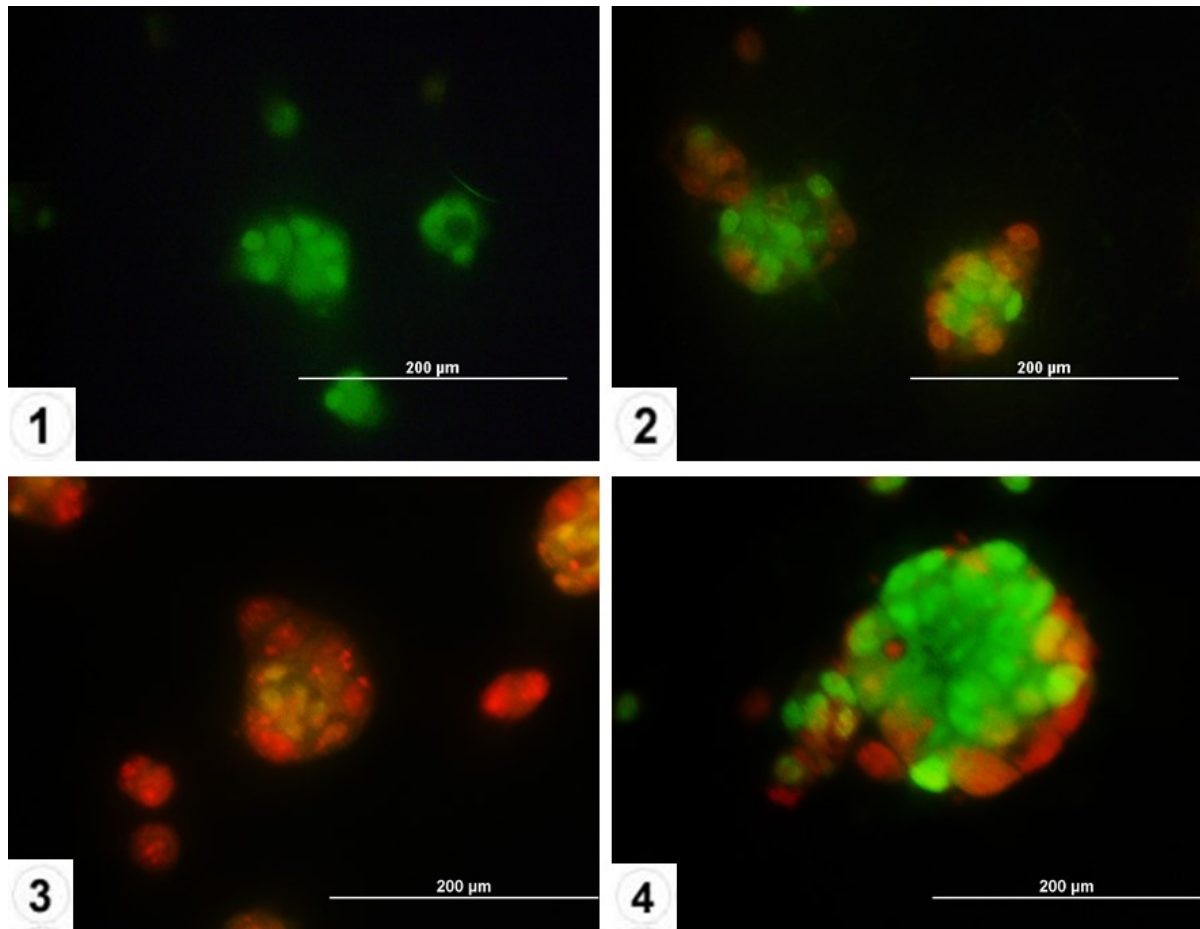


FIGURA 19. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina com brometo de etídio (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 400X).

O controle negativo (veículo) (1), as células tratadas por 24 horas com o óleo em uma concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (2) e os controles positivos clorambucil (3) e vincristina (4).

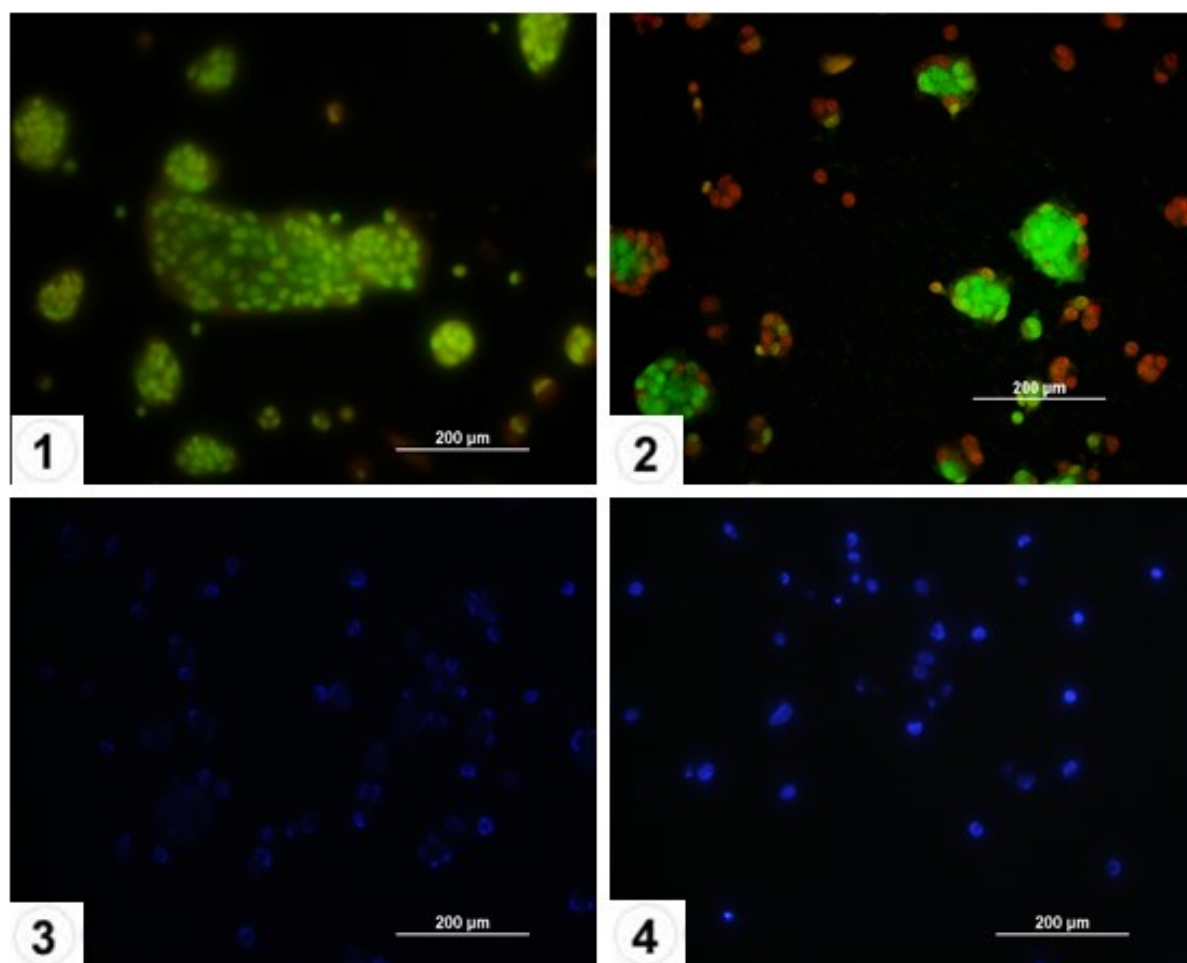


FIGURA 20. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina com brometo de etídio e Hoescht 33342 (Microscopia óptica de fluorescência – aumento de 200x).

O controle negativo (veículo) (1), as células tratadas por 24 horas com o óleo em uma concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (2), ambas com AO/BE; o controle negativo (3) e as células tratadas por 24 horas com o óleo em uma concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (4) com Hoescht 33342.

As Figura 20-3 e 4 mostram as imagens obtidas por meio da análise de condensação de cromatina pelo emprego da coloração de Hoescht 33342. Não foi observado sinais de condensação de cromatina (alta fluorescência nuclear) o que pode indicar que o processo de morte celular induzido pelo óleo volátil não é apoptótico.

Segundo Carminati (2005), as células necróticas incham e se rompem, liberando material citoplasmático. Este processo se caracteriza por injúria de um grupo de células e não por morte individual. Neste mesmo sentido células necróticas, descritas a partir de imagens de microscopia eletrônica, se caracterizam pela descontinuidade das membranas plasmáticas e das organelas, dilatação acentuada das mitocôndrias com surgimento de grandes densidades amorfas, provavelmente representando proteínas desnaturadas. O núcleo se altera, podendo se encolher, sofrer

fragmentação ou até mesmo desaparecer totalmente pela fragmentação inespecífica do DNA (ABBAS *et al.*, 2005).

5.6.2. ENSAIO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA PELA LIBERAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

Foi realizado também o ensaio de liberação de lactato desidrogenase (LDH) citoplasmática que tanto pode avaliar o potencial citotóxico da substância em questão, como pode indicar um mecanismo de morte celular.

Os resultados apresentados na Figura 21 mostram a atividade da LDH citoplasmática liberada no meio de cultivo de células Calu-3, tratadas com o óleo volátil de *L. dentata* na concentração de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo período de 24, 48 e 72 horas. Como controle positivo empregou-se o Triton X-100 para lise total celular e, por conseguinte liberação de todo o conteúdo de LDH. Houve aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na atividade de LDH liberada pelas células Calu-3 nos três períodos de coleta quando comparado ao controle negativo, todavia inferior ao controle positivo.

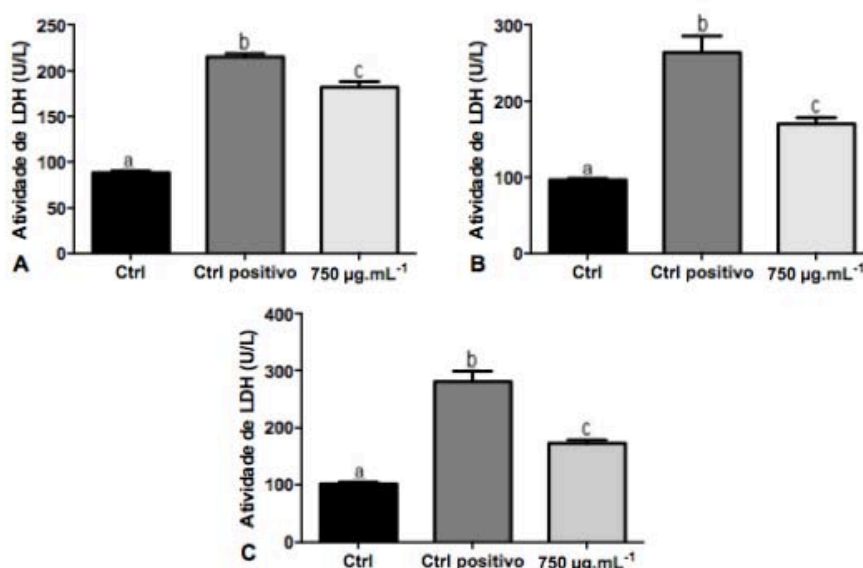


FIGURA 21. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) citoplasmática das células Calu-3.

Concentração de LDH citoplasmático ($n=4-8$), após o tratamento de 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C) com o óleo volátil na concentração de 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O controle negativo constitui-se de meio de cultivo com o veículo de solubilização do óleo volátil em concentração inferior a 0,5% e o controle positivo de uma solução de lise celular total, conforme descrito no item 4.6.2.3. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes. Letras diferentes representam diferença significativa obtida por análise de ANOVA, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ($p < 0,05$).

Células danificadas ou submetidas à estresse liberam rapidamente a enzima intracelular LDH para o meio de cultura. Isto se dá pela alteração e perda da integridade da membrana citoplasmática e necrose celular (KORZENIEWSKI & CALLEWAERT, 1983). Neste sentido, o resultado obtido poderia indicar que a atividade citotóxica da fase líquida do óleo volátil de *L. dentata* esteja associada ao mecanismo de morte celular por necrose.

5.6.3. ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Foi avaliado também se a fase vapor do óleo volátil poderia alterar o ciclo celular das células tratadas, o que poderia explicar a redução da proliferação das células Calu-3. Para tanto, utilizou-se citometria de fluxo com o emprego do fluoróforo iodeto de propídio, sendo os resultados obtidos descritos na Tabela 5.

TABELA 5. Distribuição porcentual das células Calu-3 nas fases do ciclo celular após tratamento das células com a fase vapor do óleo volátil de *L. dentata* L.

Distribuição das fases no ciclo celular				
Tratamento	Sub G0	G0/G1	S	G2/M
Controle	22,93 ± 16,69	71,99 ± 7,245 ^a	12,54 ± 2,325 ^a	25,09 ± 3,070
Óleo 750 µg/mL	28,29 ± 27,60	84,74 ± 9,253 ^b	7,767 ± 2,564 ^b	24,51 ± 3,522

As células Calu-3 foram tratadas com o óleo de *Lavandula dentata* L. por 24 horas na concentração de 750 µg.mL⁻¹. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da média (4 experimentos independentes - n=21-22). Letras diferentes representam diferença significativa foi evidenciada pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05).

Nas Figuras 22A e B estão apresentados alguns histogramas obtidos nos experimentos.

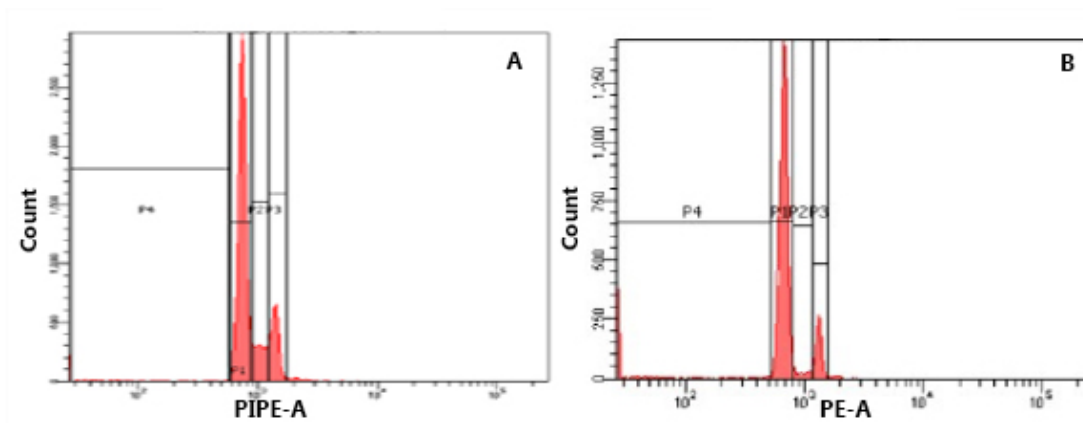


FIGURA 22. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre o ciclo celular das células Calu-3. Como controle negativo (A) empregou-se apenas o veículo e as células foram tratadas por 24 horas com o óleo em uma concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B). As fases do ciclo celular estão representadas por P4 (Sub G0); P1 (G0/G1); P2 (S); P3 (G2/M).

Neste estudo, a distribuição porcentual das células tratadas com o óleo volátil na concentração de $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas fases do ciclo celular G0/G1 e S apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas com as células sem tratamento (controle negativo). Observou-se aumento da porcentagem de células na fase G0/G1 e decréscimo no número de células na fase S. Sabe-se que o primeiro período da fase G1 é caracterizado por uma alta sensibilidade da célula a fatores ambientais. Diante disso, pode ocorrer um bloqueio e a célula entra em G0, também chamado de ponto de repouso, o que caracteriza parada de ciclo celular (BRUCE *et al.*, 2002).

5.6.4. ANÁLISE DO POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO DE MITOCÔNDRIA

A análise do potencial transmembrânico de mitocôndria com o corante fluorescente Rodamina 123 é utilizada para observar a despolarização da mitocôndria e consequentemente classificar o processo de morte como apoptótico. Os resultados obtidos nessa análise estão representados na Tabela 6.

TABELA 6. Porcentagem de polarização mitocondrial das células Calu-3 após tratamento com a fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L.

Tratamento	% de polarização mitocondrial	
	Polarizada	Despolarizada
Controle	96,59 ± 1,643	1,535 ± 1,071
Óleo 750 µg/mL	96,83 ± 2,663	1,938 ± 1,387

As células Calu-3 foram tratadas com o vapor do óleo de *Lavandula dentata* L. por 24 horas na concentração de 750 µg.mL⁻¹. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da média (n=12-15). Sendo a diferença estatística evidenciada pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05).

Nas Figuras 23A e B estão representados alguns dos histogramas obtidos durante as análises.

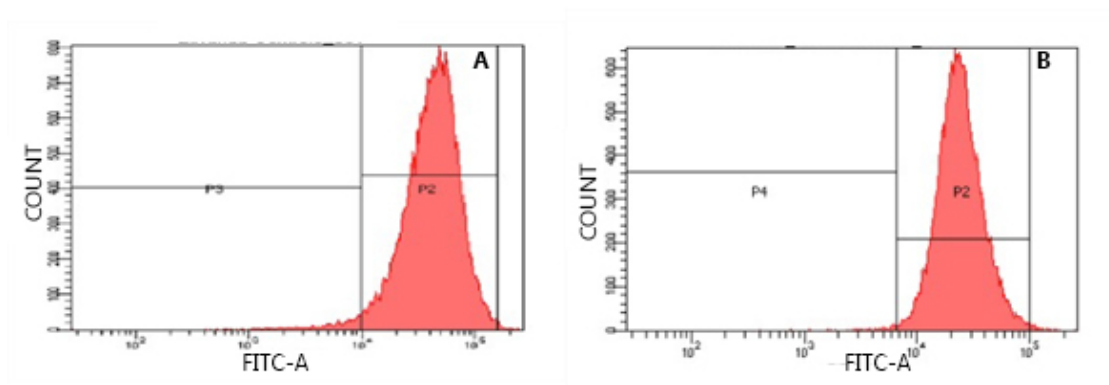


FIGURA 23. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a despolarização de mitocôndria das células Calu-3. Como controle negativo (A) empregou-se apenas o veículo utilizado para diluir as amostras e as células foram tratadas por 24 horas com o óleo em uma concentração de 750 µg.mL⁻¹ (B).

A porcentagem de polarização mitocondrial foi de 96,59 ± 1,6 e 96,83 ± 2,7% para as células controle e as tratadas com o vapor do óleo de *L. dentata*, respectivamente, sendo assim, não houve diferença estatística entre os grupos. Os histogramas revelam a mesma característica do pico P2 em ambas as amostras. Este resultado indica que o tratamento não promove a despolarização mitocondrial que, por conseguinte, é um evento do processo de morte celular induzida por apoptose.

5.6.5. ENSAIO DE EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA - ANEXINA V

O ensaio da Anexina V é comumente utilizado para revelar a perda da assimetria dos fosfolípidos de membrana e assim indicar um possível processo

apoptótico de morte celular. Os resultados obtidos neste ensaio estão representados na Tabela 7.

TABELA 7. Porcentagem de células Calu-3 que apresentaram externalização da fosfatidilserina após tratamento com a fase vapor do óleo volátil de *L. dentata* L.

Tratamento	% de células	
	Q3	Q4
Controle	81,55 ± 2,111	18,45 ± 2,111
Óleo 750 µg/mL	74,99 ± 0,9441	25,01 ± 0,9441

As células Calu-3 foram tratadas com o vapor do óleo de *Lavandula dentata* L. por 24 horas na concentração de 750 c. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da média (n=3) e Q3 – anexina negativa e Q4 – anexina positiva. Sendo a diferença estatística evidenciada pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Nas Figuras 24A e B estão representados alguns dos histogramas obtidos durante as análises.

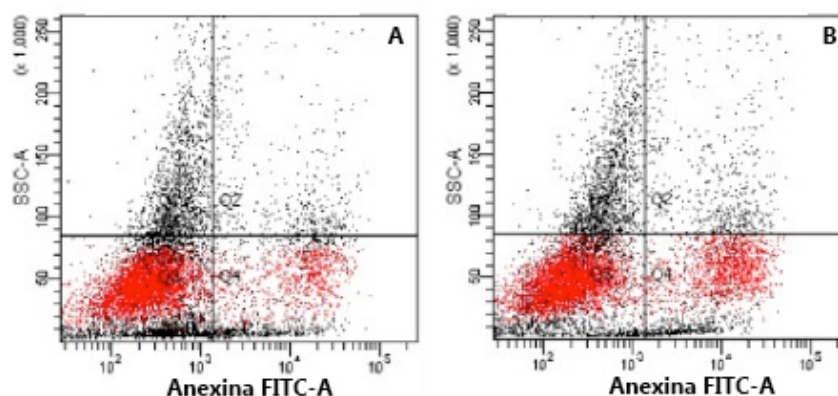


FIGURA 24. Efeito da fase vapor do óleo volátil de *Lavandula dentata* L. sobre a externalização da fosfatidilserina das células Calu-3. Como controle negativo (A) empregou-se apenas o veículo utilizado para diluir as amostras e as células foram tratadas por 24 horas com o óleo em uma concentração de 750 µg.mL⁻¹ (B).

A porcentagem de células Calu-3 que apresentaram externalização de fosfatidilserina foi de 81,55 ± 2,1% para o controle e de 74,99 ± 0,9% para as células submetidas ao tratamento com o óleo na concentração de 750 µg.mL⁻¹, portanto não houve diferença estatística entre o controle negativo e o tratamento com o óleo volátil de *L. dentata*. Porém os resultados das médias absolutas e os histogramas revelam um leve aumento na população apoptótica, o que poderia indicar eventos concomitantes de apoptose e necrose.

A atividade citotóxica de extratos obtidos de espécies de Lamiaceae também já foi descrita na literatura. Tayarani-Najaran *et al.* (2014) em estudo recente, empregando óleo volátil de *L. angustifolia*, verificou que o óleo reduziu a viabilidade celular da linhagem HeLa de maneira dose e tempo dependentes, promovendo alterações morfológicas, incluindo a redução do volume e arredondamento celular. Estas células quando coradas com o corante iodeto de propídeo, demonstraram a fragmentação do DNA, uma etapa do processo de morte por apoptose. Vale ressaltar que este óleo volátil também apresentou como componente majoritário o 1,8-cineol, todavia, na proporção 18,8%.

O potencial dos óleos voláteis está ligado à sua alta capacidade de penetração celular, devido ao seu caráter lipofílico. Ele pode atuar de diversas formas dentro da célula. Segundo Gautan (2014), os óleos voláteis podem: (1) aumentar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), resultando em apoptose celular, (2) inibir as vias de sinalização Akt, mTOR, e MAPK em diferentes etapas que resultam em up/downregulation de várias biomoléculas importantes e os genes correspondentes, também envolvidos com o processo de morte celular por apoptose, (3) regulação da expressão do fator de transcrição NF- κ B e de sua ligação ao DNA que também induz apoptose, (4) desfosforilar a proteína Akt que resulta em maior expressão de p21, a qual ou induz apoptose, por aumento de caspases ou resulta em interrupção do ciclo celular pela ligação de ciclinas, (5) despolarizar a membrana mitocondrial, resultando em maior liberação de citocromo-C para o citoplasma que induz apoptose e ainda (6) modular os mecanismos de reparo do DNA, atuando como inibidores da DNA polimerase e conduzindo a clivagem de PARP o que também resulta em apoptose das células.

Cabe comentar que o vapor gerado a partir de óleos voláteis (fase vapor), conforme relatos por Seal *et al.* (2012), também pode levar à morte celular por apoptose pela via de sinalização celular da proteína Akt. A inativação desta proteína por desfosforilação dos aminoácidos Ser473 e Th308 se dá através da supressão de mTOR e pDK1. Como consequência, têm-se a diminuição da expressão de Bcl-XL (proteína antiapoptótica) e aumento da expressão de Bax (proteína pró-apoptótica), promovendo liberação do citocromo C para o citosol, gerando a ativação de caspase 9 e caspase 3, resultando em morte celular por apoptose.

Entretanto, existem relatos de que o efeito citotóxico de óleos voláteis pode ser atribuído à indução de morte celular por necrose. De fato, Greay *et al.* (2010) quando

estudaram o efeito citotóxico do óleo volátil de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel em células de melanoma (Ae17) e (B16F10), verificaram que tanto o óleo, quanto o composto terpinen-4-ol induziram parada do ciclo celular das células com indução de morte celular por necrose, sendo relatado pelos pesquisadores o processo de morte como o de necrose primária, acompanhado com baixa proporção de células apoptóticas e com atividade dependente do tempo. Além disso, a indução de morte por necrose atribuída à *Lavandula* já foi relatada na literatura. Zamanian - Azodi *et al.* (2012), verificaram que o extrato aquoso de lavanda induz morte celular por necrose em 60% das culturas da linhagem MKN45, sendo também sido observado pelos autores presença de células apoptóticas.

Sabe-se que os trabalhos que buscam por novas substâncias para utilização no tratamento do câncer e estudam o seu mecanismo de ação, devem considerar o fato de que alguns tumores podem apresentar resistência a múltiplas drogas. Esta resistência pode estar ligada a expressão de uma proteína transportadora de membrana chamada glicoproteína-P (P-gp) que promove o efluxo do agente quimioterápico antes que o mesmo atinja a concentração terapêutica. (HUBER *et al.*, 2010; AZEREDO *et al.*, 2009).

A glicoproteína-P também pode promover o efluxo efetivo de Rodamina 123 através da membrana plasmática (WANG *et al.*, 2006), assim, pode-se sugerir que o resultado da análise do potencial transmembrânico de mitocôndria tenha sido negativo pelo efluxo do corante por ação desta proteína transmembrânica. Esta proteína também é expressa em células Calu-3 atuando ativamente no efluxo de várias substâncias (HAMILTON *et al.*, 2001).

Com isso, são necessários trabalhos futuros com a linhagem de células Calu-3 e a fase vapor do óleo essencial de *L. dentata* para elucidar uma possível indução de morte celular por necrose concomitante a um processo apoptótico, que possa ter sido bloqueado pela ação da P-gp.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- As características morfoanatômicas quando avaliadas em conjunto permitem a identificação de *L. dentata* e a diferenciação das demais do gênero. Dentre as características mais relevantes, destacam-se a folha lanceolada e crenada, presença de tricomas tectores ramificados, tricomas glandulares capitados e peltados e nervura central truncada na face abaxial.
- Com relação à composição química do óleo volátil que apresentou teor médio compatível com a literatura, foi evidenciada a presença de monoterpenos oxigenados, principalmente o 1,8-cineol e hidrocarbonados.
- O óleo apresentou um elevado potencial antimicrobiano frente às bactérias gram-positivas, gram-negativas e à levedura *Candida albicans*. Além disso, um importante valor de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.
- O óleo essencial de *L. dentata* demonstrou alguma atividade biológica com efeito antioxidante pelo método do fosfomolibdênio. Foi obtida uma fraca capacidade antioxidante relativa quando avaliada pelos métodos do DPPH• e do ABTS•⁺.
- Considerando a atividade citotóxica sobre a linhagem tumoral pulmonar Calu-3, estudada com base no ensaio de redução do MTT, SRB e DNA-PI, o óleo volátil demonstrou resultados altamente efetivos tanto da fase líquida como da fase vapor na redução da viabilidade celular.
- Os resultados das avaliações morfológicas pelos corantes de Rosenfeld, alaranjado de acridina e Hoescht, liberação de lactato desidrogenase, análise do ciclo celular, análise do potencial transmembrânico de mitocôndria e ensaio de externalização da fosfatidilserina realizados com as células Calu-3, indicam que a fase vapor do óleo em estudo pode conduzir a um processo de morte celular principalmente por necrose.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran – Patologia**. Brasil: Elsevier, 2005.
- ALI, M. A.; FARAH, M. A.; AL-HEMAID, F. M.; ABOU-TARBOUSH, F. M. In vitro cytotoxicity screening of wild plant extracts from Saudi Arabia on human breast adenocarcinoma cells. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3981-3990, 2014.
- AMARAL, R. G. **Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial da *Mentha x villosa* (Lamiaceae)**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.
- AMARANTES-MENDES, G. P.; BOSSY-WESTZED, E.; BRUNNER, T.; GREEN, D. R. Apoptosis assays. In: SPECTOR, D. L.; GOLDMAN, L. **Cell: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Leinward, 1997.
- AMIRI, A.; TAYARANI-NAJARAN, Z.; KARIMI, G.; MOUSAVI, S. Evaluation of *Lavandula angustifolia* cytotoxic and apoptotic effects on human cervical cancer cell line (Hela) in compare with normal cells. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, 2012.
- AMIRI, H. Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three *Thymus* Species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, suppl. S1, p. 5-16, 2001.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**, 2ª. ed. Viçosa: UFV, 2006.
- APONTE, J. C.; ZIN, Z.; VAISBERG, A. J.; CASTILLO, D.; MÁLAGA, E.; LEWIS, W. H.; SAUVAIN, M.; GILMAN, R. H.; HAMMOND, G. B. Cytotoxic and anti-infective phenolic compounds isolated from *Mikania decora* and *Crematosperma microcarpum*. **Planta Médica**, v. 77, n. 14, p. 1597-1599, 2011.

ARAÚJO, F. F.; AMORIN, M.; SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; FOLQUITTO, D. G.; SILVA, R. Z.; FARAGO, P. V.; TAKEDA, I. J. M.; NAKASHIMA, T.; BUDEL, J. M. Pharmacobotanical Characters of *Mikania micrantha* (Asteraceae) and its Support for Quality Control. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 3, p. 437-442, 2015.

ARLDOGAN, B. C.; BAYDA, H.; KAYA, S.; DEMIRCI, M.; OZBAW, D.; MUMCU, E. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Some Essential Oils. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 6, p. 860-864, 2002.

ATCC - **AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION**, 2014. Disponível em: <<http://www.atcc.org>>. Acesso em: 19 de novembro de 2015.

AZEREDO, F. J.; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D. Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 321-326, 2009.

BAGHERPOUR, S.; KAHRAMAN, A.; DOGAN, M.; CELEP, F.; BASER, B.; PEHLIVAN, S. The anatomical and micromorphological characteristics of *Salvia vermifolia* (Section Aethiopis Benthams, Lamiaceae) from Central Anatolia, Turkey. **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 6, p. 872-879, 2010.

BALESTRIN, L.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; DALL'STELLA, D. S. G.; MIGUEL, M. D. 2008. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 230-235, 2008.

BAPTISTA, R.; MADUREIRA, A. M.; JORGE, R.; ADÃO, R.; DUARTE, A.; DUARTE, N.; LOPES, M. M.; TEIXEIRA, G. Antioxidant and Antimycotic Activities of Two Native *Lavandula* Species from Portugal. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

BARACCA, A.; SGARBI, G.; SOLAINI, G.; LENA, Z. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1606, cap. 1-3, p. 137-146, 2003.

BARRETO, I. F.; PAULA, J. P.; FARAGO, P. V.; DUARTE, M. R.; BUDEL, J. M. Pharmacobotanical study of the leaves and stems of *Baccharis ochracea* Spreng. for quality control. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 34, n. 8, 2015.

BENBELAID, F.; KHADIR, A.; ABDOUNE, A.; BENDAHO, M.; MUSELLI, A.; COSTA, J. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 6, p. 463-472, 2014.

BERDOWSKA, I.; ZIELIŃSKI, B.; FECKA, I.; KULBACKA, J.; SACZKO, J.; GAMIAN, A. Cytotoxic impact of phenolics from *Lamiaceae* species on human breast cancer cells. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1313-1321, 2013.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Eames: Iowa State University, p. 326, 1976.

BIONDI, D.; CIONCI, P.; GERACI, C. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 8, p. 331-337, 1993.

BLAZEKOVIĆ, B.; STANIĆ, G.; PEPELJNJAK, S.; VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S. In Vitro Antibacterial and Antifungal Activity of *Lavandula × intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka'. **Molecules**, v. 16, p. 4241-4253, 2011.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1959, 1958.

BONA, C. M.; BIASI, L. A.; LIPSKI, B.; MASETTO, M. A. M.; DESCHAMPS, C. Adventitious rooting of auxin-treated *Lavandula dentata* cuttings. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, 2010.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividade biológica de folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage – Myrtaceae**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOUSMAHA, L.; BOTI, J. B.; BEKKARA, F. A.; CASTOLA, V.; CASANOVA, J. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria. **Flavour & Fragrance**, v. 21, p. 368-372, 2006.

BOZIN, B. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and their antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.

BRAUCHLER, C.; MEIMBERG, H.; HEUBL, G. Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) – Taxonomy, biogeography and conflicts. **Molecular phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 501-523, 2010.

BRUCE, A.; ALEXANDER, J.; JULIAN, L.; MARTIN, R.; KEITH, R.; PETER, W. **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed. Garland Science, 2002.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.

BRUNI, R.; BELLARDI, GRAZIA, M.; PARRELLA, G. Impact of Alfalfa mosaic virus subgroup I and II isolates on terpene secondary metabolism of *Lavandula vera* D.C., *Lavandula × alardii* and eight cultivars of *L. hybrida* Rev. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, n. 4-6, p. 189-197, 2006.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; DÖLL-BOSCARDIN, P. M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I.; SARTORATTO, A.; MAIA, B. H. L. N. S. Composition of essential oils and secretory structures of *Baccharis anomala*, *B. megapotamica* and *B. ochracea*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 1, p. 19-24, 2012.

CAL, K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. **Planta Medica**, v. 72, p. 311–316, 2006.

CALDAS, G. F. R.; OLIVEIRA, A. R. S.; ARAÚJO, A. V.; LAFAYETTE, S. S. L.; ALBUQUERQUE, G. S.; NETO, J. C. S.; COSTA-SILVA, J. H.; FERREIRA, F.; COSTA, J. G. M.; WANDERLEY, A. G. Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (Eucalyptol). **Plos One**, v. 10, n. 8, 2015.

CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 348-354, 2010.

CARMINATI, P. O. **Respostas celulares aos danos causados pelo antitumoral cisplatina em linhagem de fibroblastos humanos normais (MRC-5) e astrocítica (U343 MG-a)**. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química nova**, v. 27, n.1, 2004.

CELEP, F.; KAHRAMAN, A.; ATALAY, Z.; DOGAN, M. Morphology, anatomy and trichome properties of *Lamium truncatum* Boiss. (Lamiaceae) and their systematic implications. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 2, p. 147-153, 2011.

CELEP, F.; KAHRAMAN, A.; ATALAY, Z.; DOGAN, M. Morphology, anatomy, palynology, mericarp and trichome micromorphology of the rediscovered Turkish endemic *Salvia quezelii* (Lamiaceae) and their taxonomic implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, p. 1945–1958, 2014.

CHAN, F. K.; MORIWAKI, K.; ROSA, M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. **Methods in Molecular Biology**, v. 979, p. 65-70, 2013.

CHEN, C. N.; WU, C. L.; SHY, H. S.; LIN, J. K. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 503–506, 2003.

CHERRAT, L.; ESPINA, L.; BAKKALI, M.; PAGÁN, R.; LAGLAOUI, A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, 2013.

CHHETRI, B. K.; ALI, N. A.; SETZER, W. N. A Survey of Chemical Compositions and Biological Activities of Yemeni Aromatic Medicinal Plants. **Medicines**, v. 2, p. 67-92, 2015.

- CLARK, R. J.; HAMILTON, J. G. G.; CHAPMAN, J. V.; RHODES, M. J. C.; HALLANHAN, D. L. Analysis of monoterpenoids in glandular trichomes of catmint *Nepeta racemosa*. **The Plant Journal**, v. 11, p. 1387–1393, 1997.
- DEANS, S. G.; SVOBODA, K. P. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 5, n. 3, p. 187-190, 1990.
- DINÇ, M.; OZTURK, M. Comparative morphological, anatomical and palynological studies on the genus *Stachys* L. sect. *Ambleia* Bentam (Lamiaceae) species in Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 32, p. 113–121, 2008.
- DUARTE, M. C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.
- DUARTE, M. R.; SOUZA, D. C. Microscopic Characters of the Leaf and Stem of *Lavandula dentata* L. (Lamiaceae). **Microscopy research and technique**, v. 77, p. 647–652, 2014.
- DUTHIE, G. G. Antioxidants. **Medicine**, v. 31, ed. 4, p. 25–26, 2003.
- EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2002.
- FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; NAKASHIMA, T. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 250-255, 2005.
- FIGUEIREDO, A. C., J. G. BARROSO, L. G. PEDRO, I. SEVINATE-PINTO, AND T. ANTUNES. Composition of the essential oil of *Lavandula pinnata* L. f. var. *pinnata* grown on Madeira. **Flavour & Fragrance**, v. 10, p. 93–96, 1995.
- FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G.; TRINDADE, H.; SANCHES, J.; OLIVEIRA, C.; CORREIA, M. *Lavandula luisieri* (rozeira) Rivas-Martínez e *Lavandula pedunculata* (MILL.) CAV. **Agrotec**, maio, 2014.
- FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; TRESVENZOL, L. M. F.; FERREIRA, H. D.; PAULA, J. R. Estudo das folhas e caule de *Hyptidendron canum*

(Pohl ex Benth.) Harley, Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 192-200, 2010.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, p. 228, 1949.

FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. **Nutrition**, v. 29, ed. 1, p. 15–21, 2013.

GAUTAM, N.; MANTHA, A.; MITTAL, S. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

GEORGE, I.; NAUDIN, G.; BOLAND, S.; MORNET, S.; CONTREMOULINS, V.; BEUGNON, K.; MARTINON, L.; LAMBERT, O.; BAEZA-SQUIBAN, A. Metallic oxide nanoparticle translocation across the human bronchial epithelial barrier. **Nanoscale**, v. 7, n. 4529, 2015.

GIRAY, S.; KIRICI, S.; KAYA, D. A.; TURK, M.; SONMEZ, O. INAN, M. Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. **Talanta**, v. 74, p. 930-935, 2008.

GIULIANI, C.; BINI, L. M. Insight into the structure and chemistry of glandular trichomes of *Labiatae*, with emphasis on subfamily Lamioideae. **Plant Systematic and Evolution**, v. 276, p. 199-208, 2008.

GONÇALVES, L. A.; AZEVEDO, A. A.; OTONI, W. C. Characterization and ontogeny of the glandular trichomes of *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae). **Acta botanica brasiliica**, v. 24, n. 4, p. 909-915, 2010.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology advances**, v. 31, p. 166-174, 2013.

GOTTLIEB, O. R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, v. 39, n 8, p. 707-716, 1987.

GREAY, S. J.; IRELAND, D. J.; KISSICK, H. T. LEVY, A.; BEILHARZ, M. W.; RILEY, T. V.; CARSON, C. F. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 877–888, 2010.

GRUJIC, S.; LAUSEVIC, S. D.; DZAMIC, A.; MARIN, P. D. Anatomy and trichome micromorphology of *Stachys scardica* (Griseb.) Hayek (Lamiaceae). **Archives of Biological Science**, v. 66, n. 3, p. 1217-1226, 2014.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HALLAHAN, D. L. Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of labiate plants. In: HALLAHAN, D. L.; GRAY, J. C. Advances in botanical research. Incorporating advances in plant pathology. **Plant trichomes**, v. 31, p. 77-120, 2000.

HAMAD, K. J.; AL-SHAHEEN, S. J. A.; KASKOOS, R. A.; AHAMAD, J.; JAMEEL, M.; MIR, S. R. Essential oil composition and antioxidante activity of *Lavandula angustifolia* from Iraq. **International Research of Pharmacy**, v. 4, n. 4, 2013.

HAMID, A. A.; AIYELAAGBE, O. O.; USMAN, L. A. Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. **International Journal of Current Research**, v. 33, n. 2, p. 86-98, 2011.

HAMILTON, K. O.; BACKSTROM, G.; YAZDANIAN, M. A.; AUDUS, K. L. P-glycoprotein efflux pump expression and activity in Calu-3 cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 5, p. 647-658, 2001.

HANAMANTHAGOUDA, M. S.; KAKKALAMELI, S. B.; NAIK, P. M.; NAGELLA, P.; SEETHARAMAREDDY, H. R.; MURTHY, H. N. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v. 118, p. 836-839, 2010.

HANLIDOU, E.; KOKKINI, S.; BOSABALIDIS, A. M.; BESSIERE, J. M. Glandular trichomes and essential oil constituents of *Calamintha menthifolia* (Lamiaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 177, p. 17-25, 1991.

HARLEY, R. M.; ATKINS, S.; BUDANTSEV, A.; CANTINO, P. H.; CONN, B.; GRAYER, R.; HARLEY, M. M.; KOK, R.; KRESTOVSKAJA, T.; MORALES, A.; PATON, A. J. Labiatae. In: KADEREIT, J. W. **The families and genera of vascular plants**, v. 7, p. 167-275, 2004.

HEINRICH, G.; SCHULTZE, W.; PFAB, I.; BOTTCHE, M. The site of essential oil biosynthesis in *Poncirus trifoliata* and *Monarda fistulosa*. **Fisiologia vegetal**, v. 21, p. 257–268, 1983.

HOLDEN, C. Random samples. **Science**, v. 263, 1994.

HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.; GUY, R. K.; CHIBALE, K.; HAYNES, R. K.; PEITZ, I. Anticancer Properties of Distinct Antimalarial Drug Classes. **Plos one**, v. 8, p. 12, 2013.

HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N. P.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 10576–10581, 2010.

HUANG, N.; WANG, H. Single-wall carbon nanotubes assisted photothermal cancer therapy: Animal study with a murine model of squamous cell carcinoma. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 9, p. 638-648, 2008.

HUANG, S.; KIRCHOFF, B. K.; LIAO, J. The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): Histochemistry, ultrastructure and secretion. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 135 p. 155–167, 2008.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148-2154, 2010.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; IQBAL, T.; BHATT, I. A. **Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils**. Pakistan Journal of Botany, v. 43, n. 2, p. 1315-1321, 2011.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E.; RAO, J. R.; MAZUMDAR, A. Antibacterial activity of some *Lamiaceae* essential oils using

resazurin as na indicator of cell growth. **LWT – Food science and technology**, v. 44, p. 1199- 1206, 2011.

IMELOUANE, B.; ELBACHIRI, A.; ANKIT, M.; BENZEID, H.; KHEDID, K. Physico-Chemical Compositions and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Eastern Moroccan *Lavandula dentata*. **International Journal of Agriculture and Biology**, 11: 113–118, 2009.

IMELOUANE, B.; ELBACHIRI, A.; WATHELET, J.; DUBOIS, J.; AMHAMDI, H. Chemical composition, cytotoxic and antioxidante activity of the essential oil of *Lavandula dentata*. **World Journal of Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 103-110, 2010.

IRITI, M.; COLNAGHI, G.; CHEMAT, F.; SMADJA, J.; FAORO, F.; VISINONI, F. A. Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 4, p. 704–712, 2006.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Paraná, Curitiba, 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: MacGraw Hill Book, p. 523, 1940.

KAHRAMAN, A.; CELEP, F.; DOGAN, M. Anatomy, trichome morphology and palynology of *Salvia chrysophylla* Stapf (Lamiaceae). **South African journal of botany**, v. 76, p. 187-195, 2010.

KAISER, J. Antioxidants could spur tumors by acting on cancer gene. **Science**, v. 343, 2014.

KATO, E. T. M.; BACCHI, E. M.; HERNANDES, L. S. Farmacobotânica e atividade antiúlcera de plantas medicinais brasileiras. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Universidade Federal de Ouro Preto: Ouro Preto, p. 177–196, 2012.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D. M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 64, n. 3, p. 313-320, 1983.

KOVATCHEVA, E. G.; KOLEVA, I. I.; ILIEVA, M.; PAVLOV, A.; MINCHEVA, M.; KONUSHLIEVA, M. Antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM cell cultures. **Food Chemistry**, v. 72, p. 295-300, 2001.

LANÇAS, F. M.; CAVICHIOLI, M. Analysis of the essential oils brazilian citrus fruits by capillary gas chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 13, p. 207-209, 1990.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Record, 1997.

LEE, C.; CHEN, L.; CHANG, T.; KE, W.; LO, Y.; WANG, C. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in *Lamiaceae* plants. **Food Chemistry**, v. 124, p. 833-841, 2011.

LIU, M.; LIU, Z.; ZHOU, J. Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Isodon rubescens* (Hemsley) H. Hara [Lamiaceae]: A promising medicinal plant of China. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 8, p. 1455-1460, 2012.

MACHADO, M. P.; SILVA, A. L. L.; BIASI, L. A. Effect of plant growth regulators on in vitro regeneration of *Lavandula dentata* L. shoot tips. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 28-31, 2011.

MARIN, M.; JASNIC, N.; LAKUSIK, D.; DULETIC-LAUSEVIC, S.; ASCENSÃO, L. The micromorphological, histochemical and confocal analysis of *Satureja subs picata* Bartl. Ex Vis. Glandular Trichomes. **Archives of Biological Science**, v. 62, n. 4, p. 1143-1149, 2010.

MASETTO, M. A. M. DESCHAMPS, C.; MÓGOR, A. F.; BIZZO, H. R. Teor e composição do óleo essencial de inflorescências e folhas de *Lavandula dentata* L.

em diferentes estádios de desenvolvimento floral e épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.413-421, 2011.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDONÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; ROLIM NETO, P. J. BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n.1, p.121-125, 2011.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and woods in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, v. 2, 1950.

MEVORACH, D.; TRAHTEMBERG, U.; KRISPIN, A.; ATTALAH, M.; ZAZOUN, J.; TABIB, A.; GRAU, A.; VERBOVETSKI-REINER, I. What do we mean when we write “senescence”, “apoptosis”, “necrosis”, or “clearance of dying cells”? **Annals of the New York Academy of Sciences - Clearance of Dying Cells in Healthy and Diseased Immune Systems**, v. 1209, p. 1–9, 2010.

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.

MOTHANA, R. A. A.; GRUENERT, R.; BEDNARSKI, P. J.; LINDEQUIST, U. Evaluation of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant activities of some Yemeni plants used in folk medicine. **Pharmazie**, v. 64, 2009.

MOTHANA, R. A.; ALSAID, M. S.; HASOON, S. S.; AL-MOSAIYB, N. M.; AL-REHAILY, A. J.; AL-YAHYA, M. A. Antimicrobial and antioxidant activities and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) analysis of the essential oils of *Ajuga bracteosa* Wall. ex Benth. and *Lavandula dentata* L. growing wild in Yemen. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 15, p. 3066-3071, 2012.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard - M7-A6, 6ª ed., v. 23, 2003.

NICOLETTI, I.; MAGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C., A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 271–279, 1997.

NITZSCHE, A.; TOKALOV, S. V.; GUTZEIT, H. O.; LUDWIG-MULLER, J. Chemical and Biological Characterization of Cinnamic Acid Derivatives from Cell Cultures of Lavender (*Lavandula officinalis*) Induced by Stress and Jasmonic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2915–2923, 2004.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA, P. F.; ALVES, J. M.; DAMASCENO, J. L.; OLIVEIRA, R. A. M.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E. M.; TAVARES, D. C. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 183-188, 2015.

ONG, H. X.; TRAINI, D.; YOUNG, P. M. Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 9, p. 1287-1302, 2013.

ORLANDA, J. F. F. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (RUTACEAE)**. Tese (doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

OZDEMIR, C.; BARAN, P.; AKTAS, K. Anatomical studies in *Salvia viridis* L. (Lamiaceae). **Bangladesh Journal of Plant Taxonomy**, v. 16, n. 1, p. 65-71, 2009.

PAPAZISIS, K. T.; GEROMICHALOS G. D.; DIMITRIADIS K. A.; KORTSARIS, A. H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 208, p. 151–158, 1997.

PERERA, R. M.; BARDEESY, N. Cancer: when de antioxidants are bad. **Nature**, v. 475, ed. 43, 2011.

PETER, M. E. Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 310-312, 2011.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

PRUSINOWSKA, R.; SMIGIELSKI, K. B. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. **Herba polonica**, v. 60, n. 2, 2014.

RAPISARDA, A.; GALATI, E. M.; TZAKOU, O.; FLORES, M.; MICELI, N. *Nepeta sibthorpii* Benthham (Lamiaceae): micromorphological analysis of leaves and flowers. **Il Farmaco**, v. 56, p. 413–415, 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 738, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9 e 10, p. 1231–1237, 1999.

RIBBLE, D.; GOLDSTEIN, N. B.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v. 5, n. 12, 2005.

RIVA, A. D. **Caracterização morfológica e anatômica de *Lavandula dentata* e *L. angustifolia* e estudos de viabilidade produtiva na região centro norte, RS**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.

RIVA, A. D.; PETRY, C.; SEVER, B. M. A. Characterization of the anatomy of leaves and inflorescences of the Lavender species (Lamiaceae) used as medicine in Brazil. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 120–127, 2014.

ROESER, K. R. Die nadel der schwarzkiefer-massenprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, v.61, p.33-36, 1972.

RUFATTO, L. C.; FINIMUNDY, T. C.; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S. *Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. **Phytomedicine**, v. 20, ed. 10, p. 883–889, 2013.

RUITERS, A. K.; TILNEY, P. M.; VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M.; KAMATOU, G. P. P.; VAN WYK, B. E. The anatomy, ethnobotany, antimicrobial activity and essential oil composition of southern African species of *Teucrium* (Lamiaceae). **South African journal of botany**, v. 102, p. 175-185, 2016.

RUSSO, R.; CORASANITI, M. T.; BAGETTA, G.; MORRONE, L. A. Exploitation of Cytotoxicity of Some Essential Oils for Translation in Cancer Therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

RUSYDI, A.; TALIP, N.; LATIP, J.; RAHMAN, R. A.; SHARIF, I. Morphology of trichomes in *Pogostemon cablin* Benth. (Lamiaceae). **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 6, p. 744-749, 2013.

SALMAKI, Y.; ZARRE, S.; LINDQVIST, C.; HEUBL, G.; BRAUCHLER, C. Comparative leaf anatomy of *Stachys* (Lamiaceae: Lamioideae) in Iran with a discussion on its subgeneric classification. **Plant Systematic and Evolution**, v. 294, p. 109–125, 2011.

SANTANA, O.; CABRERA, R.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R.; MOZOS-PASCUAL, M.; RODRÍGUEZ-CONDE, M. F.; LASERNA-RUIZ, I.; USANO-ALEMANY, J.; HERRAIZ, D. Chemical and biological profiles of the essential oils from aromatic plants of agro zindustrial interest in Castilla-La Mancha (Spain). **Grasas y Aceites**, v. 63, n. 2, 2012.

SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; AMANO, E.; MESSIAS-REASON, I. J.; BUDEL, J. M. Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 85-91, 2015.

SANZ, J.; SORIA, A. C.; GARCÍA-VALLEJ, M. C. Analysis of volatile components of *Lavandula luisieri* L. by direct thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 139–146, 2004.

SARIRI, R.; SEIFZADEH, S.; SAJEDI, R. H. Anti-tyrosinase and antioxidant activity of *Lavandula* sp. extracts. **Pharmacology online**, v. 3, p. 319-326, 2009.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2ª ed. Ames: Iowa State College, p. 391, 1951.

SEAL, S.; CHATTERJEE, P.; BHATTACHARYA, S.; PAL, D.; DASGUPTA, S.; KUNDU, R.; MUKHERJEE, S.; BHATTACHARYA, S.; BHUYAN, M.; BHATTACHARYYA, P. R.; BAISHYA, G.; BARUA, N. C.; BARUAH, P. K.; RAO, P. G.; BHATTACHARYA, S. 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, 2012.

SELVARINI, V. L.; JAMES, H. The activity of cedar leaf in oil vapor against respiratory viruses: pratical application. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 11, p. 11-12, 2013.

SERAFINI, L. A.; CASSEL, E. Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Guaíba: **Agropecuária**, 2001.

SIANI, A. C. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, p. 38-43, 2000.

SIMÕES, C. M. O; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, p. 387-415, 2007.

SORO, N. K.; MAJDOULI, K.; KHABBAL, Y.; ZAIR, T. Chemical composition and antibacterial activity of *Lavandula* species *L. dentata* L., *L. pedunculata* Mill and *Lavandula abrialis* essential oils from Morocco against food-borne and nosocomial

pathogens. **International Journal of Innovation and Applied Studies**, v. 7, n. 2, p. 774-781, 2014.

SOUSA, A. C.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; ALVIANO, C. S.; GATTASS, C. R. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 677–681, 2004.

SOUZA, G. S.; CASTRO, E. M.; SOARES, A. M.; PINTO, J. E. B. P.; RESENDE, M. G.; BERTOLUCCI, S. K. V. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Biotemas**, v. 24, n. 3, p. 1-11, 2011.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p. 179, 1998.

SUAREZ-CERVERA M.; SEOANE-CAMBA, A. Pollen morphology of Iberian species of *Lavandula* L. functional and taxonomic significance. **Asociación de Palinólogos de Lengua Española**, v. 3, p. 19-31, 1987.

SUDRIÁ, C.; PALAZÓN, J.; CUSIDÓ, R.; BONFILL, M.; PIÑOL, M. T.; MORALES, C. Effect of benzyladenine and indolebutyric acid on ultrastructure, glands formation, and essential oil accumulation in *Lavandula dentata* plantlets. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 1, p. 1-6, 2001.

TAYARANI-NAJARAN, Z.; AMIRI, A.; KARIMI, G.; EMAMI, S. A.; ASILI, J.; MOUSAVI, S. H. Comparative studies of cytotoxic and apoptotic properties of different extracts and the essential oil of *Lavandula angustifolia* on malignant and normal cells. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 3, p. 424-34, 2014.

THE PLANT LIST, 2015. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 06 de maio de 2015.

TORRAS-CLAVERIA, L.; JAUREGUI, O.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; VILADOMAT, F. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) Waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8436–8443, 2007.

TOUATI, B.; CHOGRANI, H.; HASSEN, I.; BOUSSAID, M.; TOUMI, L.; BRAHIM, N. B. Chemical Composition of the Leaf and Flower Essential Oils of Tunisian *Lavandula dentata* L. (Lamiaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, 2011.

TURNER, G. W., GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 124, p. 655-663, 2000.

UPSON, T. M.; GRAYER, R. J.; GREENHAM, J. R.; WILLIAMS, C. A.; AL-GHAMDI, F.; CHEN, F. Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 991-1007, 2000.

USP (**THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**). 37^a ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

VANDERLINDE, F. A.; ROCHA, F. F.; MALVAR, D. C.; FERREIRA, R. T.; COSTA, E. A.; FLORENTINO, I. F.; GUILHON, G. M. S. P.; LIMA, T. C. M. Anti-inflammatory and opioid-like activities in methanol extract of *Mikania lindleyana*, sucuriçu. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 150-156, 2012.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006.

VINCENZI, M.; SILANOB, M.; VINCENZIC, A.; MAIALETTIA, F.; SCAZZOCCHIOA, B. Constituents of aromatic plants: eucalyptol. **Fitoterapia**, v. 73, p. 269-275, 2002.

VIUDA-MARTOS, M.; MOHAMADY, M. A.; FERNÁNDEZ-LÓPES, J.; EL-RAZIK, K. A. A.; OMER, E. A.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; SENDRA, E. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. **Food Control**, v. 22, n. 11, p. 1715-1722, 2011.

WANG, Y.; HAO, D.; STEIN, W. D.; YANG, L. A kinetic study of Rhodamine123 pumping by P-glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p. 1671–1676, 2006.

WERKER, E. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the *Lamiaceae*. **Flavor & Fragrance**, v. 8, p. 249–255, 1993.

WILKINSON, H. P. The plant surface. In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. (Eds.) **Anatomy of the Dicotyledons** - Systematic Anatomy of the leaf and stem. Oxford: Clarendon Press, v.1. p. 97-165, 1979.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Essential oils as a novel human skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 57, n. 2, p. R7-R9, 1989.

WOSCH, L.; IMIG, D. C.; CERVI, A. C.; MOURA, B. B.; BUDEL, J. M.; SANTOS, C. A. M. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: I. A morpho-anatomic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 328-343, 2015.

YAP, P. S. X.; KRISHNAN, T.; YIAP, B. C.; HU, C. P.; CHAN, K. G.; LIM, S. H. E. Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1119-1128, 2014.

YAZDI, F. T.; BEHBAHANI, B. A.; MORTAZAVI, A. Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on pathogen bacterias “in vitro”. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 5, n. 2, 2014.

YEN, G.; WU, J. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v. 65, p. 375–379, 1999.

ZAMANIAN-AZODI, M.; REZAIE-TAVIRANI, M.; HEYDARI-KASHAL, S.; KALANTARI, S.; DAILIAN, S.; ZALI, H. Proteomics analysis of MKN45 cell line before and after treatment with *Lavender aqueous* extract. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 1, p. 35–42, 2012.

ZHU, Y.; CHIDEKEL, A.; SHAFFER, T. H. Cultured Human Airway Epithelial Cells (Calu-3): A Model of Human Respiratory Function, Structure, and Inflammatory Responses. **Critical Care Research and Practice**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

ZUZARTE, M. R.; DINIS, A. M.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. Leaf trichomes of Portuguese *Lavandula* species: a comparative morphological study. **Microscopy and Microanalysis**, v. 15, cap. 3, 2009.

ZUZARTE, M. R.; DINIS, A. M.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. R.; CANHOTO, J. M. Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial crops and products**, v. 32, p. 580-587, 2010.

ZUZARTE, M.; DINIS, A. M.; CAVALEIRO, C.; CANHOTO, J.; SALGUEIRO, L. Trichomes Morphology and Essential Oils Characterization of Field-Growing and In Vitro Propagated Plants of *Lavandula pedunculata*. **Microscopy and Microanalysis**, v. 14, cap. 3, 2008.

ZUZARTE, M.; GONÇALVES, M. J.; CRUZ, M. T.; CAVALEIRO, C.; CANHOTO, J.; VAZ, S.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. *Lavandula luisieri* essential oil as a source of antifungal drugs. **Food chemistry**, v. 135, p. 1505-1510, 2012.

ZUZARTE, M.; VALE-SILVA, L.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; VAZ, S.; CANHOTO, J.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 31, p. 1359–1366, 2012.