

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

LAURA LIMA VERDE

**ANÁLISE DO EFEITO DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI
NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE LINHAGENS DE CARCINOMA DE PULMÃO**

PONTA GROSSA

2024

LAURA LIMA VERDE

**ANÁLISE DO EFEITO DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI
NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE LINHAGENS DE CARCINOMA DE PULMÃO**

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

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

PONTA GROSSA

2024

L732

81 f.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre.

CDD: 616.2

LAURA LIMA VERDE

ANÁLISE DO EFEITO DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE
PATCHOULI NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE LINHAGENS DE CARCINOMA
DE PULMÃO

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

Ponta Grossa, 31 de julho de 2024.



Documento assinado digitalmente

CARLA CRISTINE KANUNFRE

Data: 20/09/2024 13:57:27-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre – Orientadora
Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia Humana
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Documento assinado digitalmente

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS

Data: 15/10/2024 12:30:08-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Fernanda Fogagnoli Simas
Doutorado em Ciências - Bioquímica
Universidade Federal do Paraná



Documento assinado digitalmente

MARCELO MACHADO FERRO

Data: 16/10/2024 20:28:35-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro
Doutorado em Ciências - Bioquímica
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Carla Cristine Kanunfre pela oportunidade concedida para realizar este trabalho, pela dedicação, paciência, apoio, pela amizade, e por sempre acreditar no meu potencial durante todo o processo. Obrigada pelos ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional, e por todos os conselhos. Você é uma professora, orientadora e pesquisadora excepcional, que lembrarei sempre com muito carinho.

Aos meus pais e meu irmão, que não mediram esforços para que eu chegasse nessa etapa da minha vida. Obrigada pelo apoio, incentivo e amor incondicional nos momentos difíceis.

Às minhas amigas mais queridas Daniele, Giulia, Maria Ignacia, Jéssica, Giovanna, Isabela, Aline, Thayná, Paola, Milena que desde sempre estiveram presentes e interessadas em meu trabalho, por me ajudarem a manter a motivação em momentos difíceis, por me acolherem e me mostrarem que posso chegar onde almejo. A realização dessa pesquisa não teria sido possível sem o carinho, amor e companheirismo de vocês! Amo muito vocês e fico feliz de poder compartilhar essa nova etapa e conquista da minha vida ao lado de pessoas tão maravilhosas.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório M-59, Rafael, Luiz, Julia pela amizade formada, pelas experiências e conversas compartilhadas. E especialmente ao técnico Marcelo Paulo Bueno pelo auxílio nas atividades do laboratório, ao excelente ensinamento das técnicas de cultivo, pelo amparo nos experimentos, e principalmente pela grande amizade construída ao longo desse período.

Às colegas de turma Ana Carla, Caroline, Letícia e Janaína, as quais tive o prazer de conviver, pela troca de conhecimentos e horas de fofocas, como também

pelo compartilhamento de experiências vividas no laboratório, pela força e apoio mútuo dado nas fases mais difíceis de todo o processo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas por todos os ensinamentos.

À professora Dr^a. Henriette Rosa de Oliveira Emilio por ter concedido a oportunidade de realizar o estágio em docência em sua disciplina.

Aos agentes universitários Acir, Miriam, Luciane, Marlene, Terezinha, Gisele, Leonor por estarem presentes nos momentos de alegria e angústia dessa minha jornada, por todo o amor e carinho, pelas risadas, almoços e momentos de felicidade compartilhados. Obrigada por terem me recebido de braços abertos, e por me ajudarem sempre que precisei. Vocês têm um lugar especial no meu coração.

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

RESUMO

Dentre os cânceres, o de pulmão é um dos que mais apresenta resistência aos tratamentos tradicionais, motivo pelo qual se ressalta a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, os óleos essenciais (OEs) surgem como uma opção de tratamento complementar promissora, pois são compostos constituídos por moléculas voláteis com diversas propriedades farmacológicas e que podem, pela via inalatória, ser entregues diretamente ao tecido pulmonar. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da fase vapor (FV) do OE comercial de patchouli na viabilidade e proliferação de células de adenocarcinoma de pulmão humano (A549), carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano (H292), e em fibroblastos de pulmão humano (MRC-5). Como estratégia experimental, as células foram plaqueadas nos oito poços centrais das placas de cultivo de 24 poços e tratadas por 72h com o vapor do OE em diferentes concentrações (0-1000 µg/mL/poço), o qual foi adicionado nos 16 poços restantes e desprovidos de células. A citotoxicidade foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT e coloração com sulforodamina B (SRB), e a partir deles foram calculados os valores da concentração do OE capaz de gerar vapor suficiente para reduzir a viabilidade celular em 50% (ICV₅₀) e o índice de seletividade (IS), calculado pela razão da ICV₅₀ da linhagem não tumoral (MRC-5) pela ICV₅₀ das linhagens tumorais (A549 e H292). O ICV₅₀ foi também utilizado para realização de ensaios tempo-resposta. Ademais, o efeito da FV do OE de patchouli sobre a linhagem A549 foi também avaliado quanto à capacidade de migração celular e distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, empregando respectivamente, o ensaio de fechamento de fenda e citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo (IP). A FV do OE reduziu a viabilidade celular das duas linhagens tumorais, contudo, a linhagem A549 foi mais sensível ao tratamento, com o valor de ICV₅₀ obtido para o ensaio de redução do MTT de 169,74 µg/mL e 156,13 µg/mL para o ensaio da SRB. Para a linhagem H292, os valores calculados foram de 215 e 220,74 µg/mL para os ensaios de MTT e SRB, respectivamente. Para linhagem controle (MRC-5), o OE demonstrou efeito citotóxico, com ICV₅₀ de 333,75 (MTT) e 316,30 µg/mL (SRB), todavia, o IS apresentou valor inferior a 2, indicando que a FV do OE não foi seletiva. Os resultados do ensaio de fechamento de fenda são sugestivos de que o OE de patchouli, de maneira significativa, reduz a migração na linhagem A549. A FV do OE de patchouli reduziu a proliferação celular na concentração de 170 µg/mL de maneira tempo-dependente e induziu parada do ciclo celular em células A549 por meio do aumento do percentual de células em G0/G1 e diminuição do percentual de células nas fases S e G2/M. Em conclusão, esses dados indicam que a FV do OE de patchouli reduz a proliferação celular de linhagens tumorais de câncer de pulmão. Todavia, estudos futuros ainda precisam ser realizados para elucidar os mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: Linhagem A549; *Pogostemon cablin* Benth; Câncer de pulmão; Linhagem H292; Viabilidade celular.

ABSTRACT

Among cancers, lung cancer is one of the most resistant to traditional treatments, which highlights the need for the development of new therapeutic strategies. In this context, essential oils (EOs) have emerged as a promising complementary treatment option, as they are compounds made up of volatile molecules with several pharmacological properties that can be delivered directly to lung tissue via inhalation pathway. The aim of this study was to evaluate the effect of the vapor phase (VP) of commercial patchouli EO on the viability and proliferation of human lung adenocarcinoma cells (A549), human lung mucoepidermoid carcinoma cells (H292), and human lung fibroblasts (MRC-5). As an experimental strategy, the cells were plated in the eight central wells of the 24-well culture plates and treated for 72 hours with the EO vapor at different concentrations (0-1000 $\mu\text{g/mL/well}$), which was added to the remaining 16 cell-free wells. Cytotoxicity was determined using the MTT reduction and sulforhodamine B (SRB) staining assays, from which the concentration of EO capable of generating enough vapor to reduce cell viability by 50% (ICV_{50}) and the selectivity index (SI), calculated by the ratio of the ICV_{50} of the non-tumor cell line (MRC-5) to the ICV_{50} of the tumor cell lines (A549 and H292), were calculated. The ICV_{50} was also used to carry out time-response assays. Furthermore, the effect of the VP of patchouli EO on the A549 cell line was also assessed in terms of cell migration capacity and cell distribution in different phases of the cell cycle, using the scratch assay and flow cytometry using propidium iodide (PI), respectively. The VP of the EO reduced cell viability for both tumor cell lines, however, the A549 cell line was more sensitive to the treatment, with an ICV_{50} value obtained for the MTT reduction assay of 169.74 $\mu\text{g/mL}$ and 156.13 $\mu\text{g/mL}$ for the SRB assay. For the H292 cell line, the calculated values were 215 and 220.74 $\mu\text{g/mL}$ for the MTT and SRB assays, respectively. For the control cell line (MRC-5), the EO exhibited a cytotoxic effect with an ICV_{50} of 333.75 $\mu\text{g/mL}$ (MTT) and 316.30 $\mu\text{g/mL}$ (SRB), however, the SI value was less than 2, indicating that the VP of the EO was not selective. The results of the scratch assay suggest that patchouli EO significantly reduces migration in the A549 cell line. The VP of patchouli EO decreased cell proliferation at a concentration of 170 $\mu\text{g/mL}$ in a time-dependent manner and induced cell cycle arrest in A549 cells by increasing the percentage of cells in the G0/G1 and decreasing the percentage of cells in the S and G2/M phases. In conclusion, these findings indicate that the VP of patchouli EO reduces the cell proliferation of lung cancer tumor cell lines. However, futures studies still need be to carried out to elucidate the mechanisms involved.

Keywords: A549 cell line; *Pogostemon cablin* Benth; Lung cancer; H292 cell line; Cell viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Números estimados de novos casos de cânceres em 2020 em ambos os sexos e todas as idades	19
Figura 2 –	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais estimados para 2023 por sexo, excluindo o câncer de pele não melanoma	20
Figura 3 –	Mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral dos OEs	31
Figura 4 –	<i>Pogostemon cablin</i> Benth	32
Figura 5 –	Ilustração da estratégia experimental para avaliação da citotoxicidade da fase vapor do OE	36
Figura 6 –	Efeito da fase vapor do OE de patchouli em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular das linhagens A549 e H292	44
Figura 7 –	Efeito da fase vapor do OE de patchouli sobre a linhagem MRC-5 com perfil de resposta mais refratário	48
Figura 8 –	Efeito da fase vapor do OE de patchouli sobre a linhagem MRC-5 com perfil de resposta mais sensível	49
Figura 9 –	Efeito da fase vapor do OE de patchouli sobre a viabilidade celular nos períodos de 24, 48 e 72h	53

Figura 10 – Registro de imagem da microscopia óptica do efeito da fase vapor do OE de patchouli na migração celular da linhagem A549 tratada com a concentração do ICV ₅₀	55
Figura 11 – Efeito da fase vapor do OE de patchouli sobre a migração celular na linhagem A549	56
Figura 12 – Efeito da fase vapor do OE de <i>Pogostemon cablin</i> sobre o ciclo celular das células A549	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Atividade antitumoral de diversos OEs em diferentes linhagens tumorais <i>in vitro</i>	28
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores do ICV_{50} para as linhagens A549 e H292 após tratamento com o vapor do OE de patchouli	43
Tabela 2 –	Valores de ICV_{50} para os dois perfis de resposta da linhagem MRC-5 após tratamento de 72h com o vapor do OE de patchouli	49
Tabela 3 –	Valor do IS da fase vapor do OE de patchouli nos dois perfis de resposta da linhagem MRC-5 ao tratamento por 72h	50
Tabela 4 –	Distribuição percentual das células A549 nas fases do ciclo celular após tratamento das células com a fase vapor do OE de <i>P.cablin</i>	59

LISTAS DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína Quinase B
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutada
ATR	Ataxia Telangiectasia Rad-3 relacionada
Bax	Proteína X Associada à BCL-2
Bcl-2	Proteína Associada ao Linfoma de Células B
CDC20	Proteína do Ciclo de Divisão Celular 20
CDK	Quinases Dependentes de Ciclina
CHK1	Quinase do Ponto de Checagem 1
CHK2	Quinase do Ponto de Checagem 2
CPCP	Câncer de Pulmão de Células Pequenas
CPCNP	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas
DMSO	Dimetilsulfóxido
E-caderina	Caderina Epitelial
EMT	Transição Epitélio-Mesenquimal
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FAK	Quinase de Adesão Focal
Fas	Receptor ou Proteína Pró-Apoptótica
FoxM1	Proteína Forkhead Box M1
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
JNK	c-Jun N-terminal Quinase
MDR1	Gene de Resistência a Múltiplas Drogas
MMP2	Metaloproteinase de Matriz 2
MMP7	Metaloproteinase de Matriz 7
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	(Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio)
OE	Óleo Essencial
P53	Fosfoproteína Supressora de Tumor

PARP1	Poli (ADP-ribose) Polimerase 1
PNCA	Antígeno Nuclear de Célula em Proliferação
Rb	Proteína do Retinoblastoma
Smad 2	<i>Mothers Against Decantaplegic Homolog 2</i>
Smad 3	<i>Mothers Against Decantaplegic Homolog 3</i>
SRB	Sulforodamina B
TP53	Gene da p53
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	CÂNCER: EPIDEMIOLOGIA	18
3.2	ETIOLOGIA DO CÂNCER	20
3.3	CÂNCER DE PULMÃO	22
3.3.1	Tratamento do câncer de pulmão	25
3.4	ÓLEOS ESSENCIAIS	27
3.4.1	Patchouli (<i>Pogostemon cablin</i> Benth)	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	ÓLEO ESSENCIAL	35
4.2	CULTIVO DAS LINHAGENS E TRATAMENTO	35
4.2.1	Tratamento	36
4.3	ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	37
4.3.1	Redução do 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MTT)	37
4.3.2	Coloração de proteínas utilizando-se sulforodamina B	38
4.3.3	Ensaio de viabilidade celular tempo-dependente em células A549 ...	39
4.3.4	Cálculo do ICV ₅₀ e do índice de seletividade (IS)	39
4.4	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS A549 PELO ENSAIO DE FECHAMENTO DE FENDA	40
4.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FASE VAPOR DO OE NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR	41
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FASE VAPOR DO OE DE PATCHOULI NA VIABILIDADE CELULAR	43
5.1.1	Linhagens tumorais A549 e H292	43
5.1.2	Linhagem controle – MRC-5	47

5.1.3	Viabilidade tempo-dependente da fase vapor do OE em células A549	52
5. 2	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO DE FECHAMENTO DE FENDA	53
5. 3	ANÁLISE DA FASE VAPOR DO OE DE PATCHOULI NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR	57
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A – PARECER TÉCNICO DO ÓLEO ESSENCIAL	78
	ANEXO B – REGISTROS FOTOGRÁFICOS DO ENSAIO DE FECHAMENTO DE FENDA	80

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças mais devastadoras e desafiantes em virtude à sua progressão para metástases potencialmente fatais. Entre os diversos tipos, cabe destacar o câncer de pulmão, que, em última pesquisa mundial, foi responsável pelo maior índice de mortalidade (Arafat *et al.*, 2022).

No Brasil, conforme dados divulgados pelo Instituto Nacional de Câncer, estimaram-se para cada ano do triênio 2020-2022, 30.200 novos casos de câncer de pulmão (Inca, 2020). Infelizmente, no Brasil 70% dos casos de câncer de pulmão diagnosticados encontram-se em estágios avançados ou apresentam metástase (Mathias *et al.*, 2020), sendo esses os fatores que contribuem para que o câncer de pulmão seja considerado a principal causa de morte no país.

Em geral no câncer de pulmão, o tumor é considerado irressecável, dessa forma o tratamento preconizado consiste em radioterapia e quimioterapia (Molina *et al.*, 2009). Entretanto, a responsividade aos tratamentos pode variar entre os indivíduos, onde alguns demonstram uma resposta completa ou parcial, ou simplesmente não respondem (Lage, 2008; Shanker *et al.*, 2010).

Com relação à quimioterapia, a resistência aos fármacos utilizados é uma das principais razões que resultam na falha terapêutica do tratamento do câncer (Ramos; Sadeghi; Tabatabaeian, 2021). Além da resistência, os efeitos colaterais advindos dos tratamentos levam a busca de novas abordagens e novos tratamentos complementares com compostos de baixa citotoxicidade para as células não tumorais e que não levem a resistência.

Neste sentido, os estudos de compostos naturais com potencial atividade antitumoral vêm se destacando devido à capacidade de interferirem em diversas vias de sinalização, influenciando a atividade molecular das células, conferindo assim potencial uso como terapia adjuvante no tratamento do câncer (Hashem *et al.*, 2022).

Entre os compostos naturais estudados estão os óleos essenciais (OE) provenientes do metabolismo secundário das plantas aromáticas. Os OEs se caracterizam como uma mistura complexa de componentes voláteis de baixo peso molecular, com caráter lipofílico, constituídos principalmente por terpenos (Dhifi *et al.*, 2016).

O composto majoritário do OE de patchouli, o patchoulol já demonstrou, em sua fase líquida, efeitos citotóxicos em células tumorais de pulmão. Liang *et al.* (2023) relataram que o patchoulol demonstrou ser citotóxico à linhagem de câncer de pulmão A549, induzindo à apoptose e parada do ciclo as células resistentes à vincristina. Ademais, apresentou efeitos sinérgicos inibitórios em combinação com o fármaco cisplatina. Todavia, ainda não há informações na literatura a respeito da atividade antitumoral da fase vapor deste OE.

Pensando-se no desenvolvimento de novos tratamentos, é necessário selecionar a melhor forma de administração de um fármaco, de modo que, sua entrega e absorção sejam eficazes. Pelo fato de que os OEs apresentam em sua composição componentes voláteis, estes podem constituir-se uma promissora modalidade de tratamento, como terapia adjuvante, em virtude de que seus compostos podem ser entregues diretamente ao tecido pulmonar pela via inalatória (Edris, 2007).

Cumprе comentar que o uso dos OEs poderia também se tornar uma terapia complementar ao tratamento. De fato, a aromaterapia, dentre as terapias complementares, é considerada uma boa opção para tratar e reduzir a ansiedade, e o estresse, promovendo o alívio de sintomas secundários do paciente oncológico (Li, D. *et al.*, 2022; Shin *et al.*, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da fase vapor do OE de patchouli (*Pogostemon cablin*) na viabilidade e proliferação celular de linhagens celulares de carcinoma de pulmão (A549 e H292).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a viabilidade celular da fase vapor do OE de patchouli em células tumorais A549, H292 e em não tumoral (MRC-5).
- Calcular a concentração do OE capaz de gerar vapor suficiente para reduzir a viabilidade celular em 50% (ICV₅₀) e o índice de seletividade (IS).
- Avaliar a capacidade de migração celular de células A549 tratadas com a fase vapor do OE de patchouli.
- Avaliar o efeito da fase vapor do OE no porcentual de distribuição de células A549 nas diferentes fases do ciclo celular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER: EPIDEMIOLOGIA

Por definição o câncer, também denominado de neoplasia ou tumor maligno, se refere a um extenso grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal das células de qualquer órgão ou tecido, as quais ultrapassam os limites usuais, podendo invadir outras partes do corpo ou se espalhar para outros órgãos, processo conhecido como metástase (OMS, 2023).

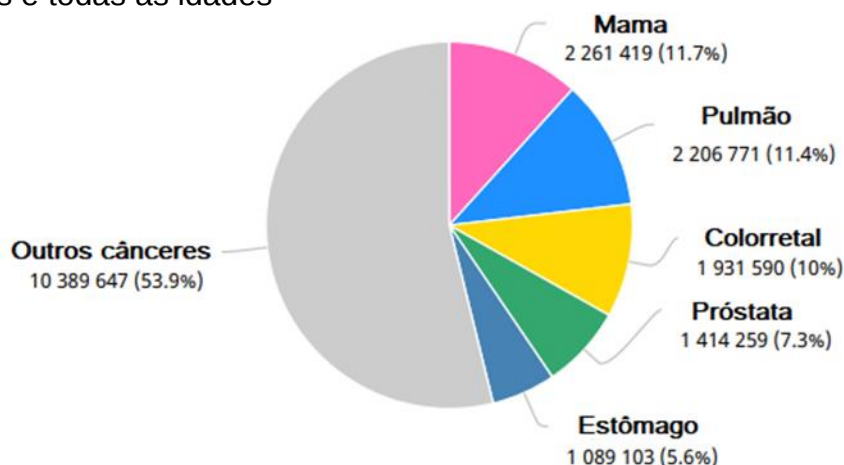
Segundo o trabalho de Sung e colaboradores (2021), que apresenta dados atualizados sobre as estatísticas do câncer utilizando as estimativas do banco de dados da GLOBOCAN 2020 de incidência e mortalidade por câncer, realizada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), o câncer está entre a primeira ou segunda principal causa de morte no mundo antes dos 70 anos em 112 países.

Considerando as últimas estimativas mundiais realizadas sobre o câncer pela GLOBOCAN para 2020, foram registrados 19,3 milhões de novos casos e quase 10 milhões de mortes, e até o ano de 2040 espera-se um aumento de 47% de casos (28,4 milhões de casos) (Globocan, 2021; Sung *et al.*, 2021).

Dentre as diversas neoplasias existentes, excluindo o câncer de pele não melanoma, as mais frequentes são de câncer de mama (11,7%), seguido por câncer de pulmão (11,4%), câncer colorretal (10%), câncer de próstata (7,3%) e câncer de estômago (5,6%) (Figura 1), sendo o câncer de pulmão o de maior causa de mortalidade (Globocan, 2021).

No Brasil, para o novo triênio 2023-2025, são esperados 704 mil novos casos a cada ano, com o câncer de pele não melanoma continuando como o mais incidente, seguido por mama, próstata, cólon e reto, pulmão e estômago (INCA, 2022a).

Figura 1 - Números estimados de novos casos de cânceres em 2020 em ambos os sexos e todas as idades



Fonte: Adaptado de: GLOBOCAN. World fact sheets. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>. Acesso em: 19 maio. 2023.

Para o ano de 2023, em homens, desconsiderando o câncer de pele não melanoma, os de maiores incidência serão o de próstata correspondendo a 30% dos novos casos, cólon e reto (9,2%), traqueia, brônquios e pulmão (7,5%), estômago (5,6%), e cavidade oral (4,6%). Para as mulheres, o mais incidente será o câncer de mama (30,1%), cólon e reto (9,7%), colo do útero (7%), traqueia, brônquios e pulmão (6%) e tireoide (5,8%) (Figura 2) (Santos *et al.*, 2023).

A taxa de incidência e mortalidade do câncer vem aumentando ao longo dos anos. Esta alta está correlacionada com a transição demográfica, onde há um aumento no número de adultos-idosos, sendo mais suscetíveis a doenças associadas ao envelhecimento (Cao; Soerjomataram; Bray, 2020).

Essa transição epidemiológica também pode ser devida à mudança na exposição a fatores de risco, como poluentes ambientais. As mudanças no ambiente físico, bem como as mudanças no estilo de vida, a exemplo a dieta, também influenciam (Cao; Soerjomataram; Bray, 2020).

Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais estimados para 2023 por sexo, excluindo o câncer de pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022a.

Além disso, o aumento de casos e mortes devido ao câncer intervém diretamente no potencial socioeconômico do país, em virtude de afetar a população, reduzindo a produtividade e a qualidade de vida do acometido. Outra consequência é um sistema de saúde sobrecarregado, provocando débito aos cofres públicos. Assim, é de suma importância que o estado invista em diagnóstico precoce, medidas preventivas, estudos para o desenvolvimento de novos fármacos, corroborando para a diminuição de gastos futuramente e para o aumento da sobrevida do enfermo (Guimarães, 2019).

A etiologia das neoplasias geralmente está associada ao ciclo celular, portanto considerada como uma “doença do ciclo celular”, visto que a desregulação do ciclo celular é uma das alterações mais frequentes no processo de desenvolvimento do tumor. Portanto, é necessário entender os mecanismos celulares da desregulação da progressão do ciclo celular envolvidos no processo da carcinogênese, para que assim novas estratégias terapêuticas possam ser elaboradas (Park; Lee, 2003).

3.2 ETIOLOGIA DO CÂNCER

O processo de transformação de uma célula normal em cancerosa é denominado de tumorigênese ou carcinogênese. Esse processo é complexo e multifatorial, que envolve múltiplas alterações genéticas e epigenéticas que são causadas por diversos fatores, entre eles a exposição a agentes carcinogênicos,

predisposição genética e fatores ambientais, que resultam em uma proliferação descontrolada das células (Lele, 2023).

Diversos mecanismos moleculares já identificados contribuem para este processo. Dentre eles, destacam-se como mais importantes a ativação dos oncogenes e inativação dos genes supressores tumorais (Lele, 2023).

Em células normais, os proto-oncogenes são genes que codificam fatores de crescimento e seus receptores, proteínas regulatórias do ciclo celular, proteínas quinases, fatores de transcrição que estimulam a progressão do ciclo celular. Já os genes supressores de tumores codificam proteínas envolvidas no reparo do DNA, proteínas do ponto de checagem que restringem a progressão do ciclo celular, proteínas de indução da apoptose, que garantem o controle do ciclo celular (Joyce; Rayi; Kasi, 2023; Newkirk; Brannick; Kusewitt, 2017).

As células em resposta à exposição a agentes carcinógenos, como radiação ionizante, poluentes atmosféricos, aminas aromáticas (ex: tabaco), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, níquel, arsênico, cromo, agentes alquilantes, apresentam danos ao DNA. Esses danos causam mutações em genes de reparo do DNA e mutações que promovem a inativação dos genes supressores e ativação dos proto-oncogenes, transformando-os em oncogenes, dando início ao processo de carcinogênese (Das *et al.*, 2020).

Além da mutação, as alterações epigenéticas são fatores que também são responsáveis pelo início do processo de carcinogênese. Essas alterações são reversíveis e consistem na metilação do DNA, na qual a hipometilação pode ativar os proto-oncogenes e a hipermetilação pode inativar os genes supressores de tumor, modificações na histona, que podem ativar ou inativar genes, modificações na cromatina, entre outros (Das *et al.*, 2020; Kanwal; Gupta, K.; Gupta, S., 2015).

Esse processo causado por exposição a agentes carcinogênicos que ocasionam alterações genéticas nas células normais e levam a susceptibilidade dessas células de se tornarem malignas e imortais é o primeiro estágio do processo de carcinogênese definido como iniciação (Oliveira *et al.*, 2007; Weston; Harris, 2003).

Após, essas células passam pelo estágio de promoção, onde as células iniciadas se proliferam podendo formar um tumor benigno, mas também podem ser transformadas em malignas de forma lenta e gradual por meio da exposição

prolongada a agentes oncopromotores. O último estágio é a progressão, onde há transformação de uma lesão pré-maligna ou benigna em maligna, devido à expressão do fenótipo maligno, que acarreta em maior instabilidade genômica, proliferação desenfreada, invasão e metástase, como também em mudanças bioquímicas, metabólicas e morfológicas das células (Oliveira *et al.*, 2007; Weston; Harris, 2003).

Além disso, outras características são adquiridas pelas células que passam pelo processo de carcinogênese. A indução da angiogênese, que garante os nutrientes necessários para o crescimento das células tumorais, e o “escape” da apoptose, a autossuficiência nos sinais de crescimento, potencial de replicação ilimitado levando a imortalidade, e a capacidade de evadir da ação do sistema imunológico (Hanahan; Weinberg, 2011).

Mutações que causam inativação do gene supressor *TP53*, que codifica a proteína p53, são os mais frequentes nos cânceres humanos. Ademais, a inativação da família INK4, por deleções, mutações e metilação está envolvida no desenvolvimento de vários cânceres, sobretudo a p16 e p15. Também a superexpressão de ciclinas D e E, superexpressão de quinases dependente de ciclinas (CDKs) CDK4 e CDK6 estão envolvidos na patologia de alguns tumores (Chen *et al.*, 2022; Johnson; Walker, 1999).

3.3 CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão é um dos cânceres mais diagnosticados e a principal causa de morte mundialmente. Em homens, ele é o de maior incidência e também o de maior mortalidade, e em mulheres, é o terceiro em incidência e o segundo em mortes (Sung *et al.*, 2021; Thai *et al.*, 2021).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimam-se, para cada ano do triênio de 2023-2025, 18.020 novos casos de câncer de pulmão entre os homens e 14.540 entre as mulheres, sendo o quarto tipo de câncer mais frequente na população (INCA, 2022a). Em 2020, foi responsável por 28.620 mortes, sendo a principal causa de óbitos em homens com 16.009 mortes registradas, e o segundo entre mulheres, com 12.609 mortes (INCA, 2022b).

Em sua fase inicial, o câncer de pulmão é constantemente assintomático, levando anos para crescer e produzir sinais ou sintomas que possam alertar o indivíduo, obtendo como consequência um diagnóstico tardio, onde os tumores estão em um estágio avançado ou localmente avançado, tendo, em decorrência, um prognóstico pior (Polanco *et al.*, 2021). Esse diagnóstico tardio está associado à alta letalidade, devido à taxa de sobrevivência dos pacientes com câncer de pulmão, após cinco anos a partir do diagnóstico, ser de 10% a 20% (De Lima; Cancela; De Souza, 2022).

Os principais acometidos por essa doença, de acordo com a Sociedade Americana de Câncer (ACS), são as pessoas mais idosas, de 65 anos ou mais, sendo relativamente raro na população jovem. Entretanto, com o aumento da incidência do câncer de pulmão, a média de idade do diagnóstico tem diminuído (Acs, 2023; Shi *et al.*, 2021).

O uso do tabaco principalmente por meio do fumo do cigarro ou por exposição passiva é considerado um dos principais fatores de risco que causam o câncer de pulmão, sendo responsável pela ocorrência de 80% a 90% dos casos diagnosticados. Assim, com relação à mortalidade, os fumantes apresentam quinze vezes mais chances de morrer devida essa doença do que pessoas que nunca fumaram (Inca, 2022c; Thun *et al.*, 2008; Warren; Cummings, 2013).

As fumaças dos cigarros contêm mais de 4.000 componentes, com pelo menos 50 agentes carcinogênicos identificados, entre eles estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aminas aromáticas, benzenos, cloreto de vinila, arsênio, cromo e as *N*-nitrosaminas, onde dentre elas, o 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol parece ser o mais importante indutor do câncer de pulmão (Bade; Dela Cruz, 2020).

Além do mais, a exposição ao ar poluído, contendo substâncias carcinogênicas produzidas pela queima de combustíveis fósseis, que incluem hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais como arsênio, níquel, cromo, a exposição à emissão de gases de diesel, aos asbestos, gás radônio, à radiação, e exposição ocupacional ao cádmio, éter bis-(clorometílico), berílio, cromo hexavalente, entre outros, também contribuem para o desenvolvimento do câncer de pulmão (Malhotra *et al.*, 2016; Mao *et al.*, 2016).

Os agentes carcinogênicos levam a alterações genéticas e epigenéticas que resultam em danos ao DNA, transformando as células epiteliais normais do pulmão em células neoplásicas (Larsen; Minna, 2011). Podendo-se citar que a fumaça do cigarro gera alterações morfológicas bem caracterizadas do epitélio brônquico, progredindo de hiperplasia das células basais para metaplasia, displasia grave para carcinoma *in situ*, e, por último, o carcinoma propriamente (Gridelli *et al.*, 2015).

Essas alterações causadas ao epitélio brônquico, que dão origem ao carcinoma de pulmão, são categorizadas em dois principais grupos histológicos: os carcinomas de pulmão de células pequenas (CPCP), que compreende tumores altamente malignos derivados de células que apresentam características endócrinas, representando 15% do total dos diagnósticos, e o carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP), o qual é subcategorizado em: adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de células escamosas, e carcinomas de células grandes, representando 85% do total de diagnósticos (Cruz; Tanoue; Matthay, 2011; Inamura, 2017).

O adenocarcinoma de pulmão é o mais predominante, totalizando 60% dos diagnósticos de CPCNP, com incidência aumentando constantemente nas últimas décadas. Ele forma uma massa periférica com fibrose central e enrugamento pleural, e está localizado majoritariamente na periferia, mas frequentemente ocorre na região central. Os carcinomas de células escamosas correspondem a cerca de 20% dos carcinomas de pulmão, e normalmente estão localizados na região central do pulmão, ao longo das vias aéreas principais. As células desse tumor apresentam núcleos hipercromáticos, citoplasma moderado a abundante, com pontes intercelulares delineadas e nucléolos visíveis a imperceptíveis (Moon *et al.*, 2016; Zheng, M., 2016).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (NCI), os carcinomas de grandes células correspondem a 10% dos cânceres de pulmão, representando a minoria dos casos de CPCNP. São encontrados perifericamente, possuem aparência necrótica e são volumosos. Eles não apresentam diferenciação específica da linhagem, e não apresentam evidências morfológicas e imuno-histoquímicas de adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas. As células tumorais são

grandes, com forma poligonal, possuem núcleos pleomórficos e vesiculares (Nci, 2023a; Zheng, M., 2016).

As principais alterações genéticas envolvidas na patologia do CPCNP estão à perda da proteína Rb em 15% dos casos, redução dos níveis de p27 em 30-60%, aumento da expressão de ciclina D1 em 35-50%, redução da expressão de p57 em 89% dos carcinomas, aumento da superexpressão de ciclina E (50%), nível elevado de ciclina A e B1, ausência da expressão de CHK2 pela hipermetilação do promotor, perda da proteína p16 por deleção, hipermetilação do promotor ou mutação do gene, e, juntamente, há perda da proteína p15, correspondendo entre 40-50% dos casos. Também são observadas mutações na proteína p53 em 50% dos CPCNP (Baldi *et al.*, 2011; Eymin; Gazzeri, 2009).

3.3.1 Tratamento do câncer de pulmão

Considerando a grande diversidade biológica do câncer em geral, foi elaborada uma classificação precisa do tumor, chamada de Sistema de estadiamento Tumor-Nódulo-Metástase (TNM), que descreve a extensão anatômica da doença. Ela possui três componentes: a categoria T, onde é descrito o tamanho e a extensão do tumor primário; em N, a extensão do envolvimento regional dos linfonodos; e M, a presença ou ausência de disseminação metastática distante. Essa classificação é indispensável para determinar o prognóstico, recomendar tratamento apropriado, melhorar e otimizar o tratamento, avaliar a resposta do paciente ao tratamento (Lababede; Meziane, 2018; Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015).

As principais alternativas de tratamento para o câncer de pulmão são a ressecção cirúrgica, radioterapia, imunoterapia, quimioterapia ou a combinação dessas abordagens (Nci, 2023b). Nos estágios iniciais do CPCNP, onde o câncer está restrito ao pulmão, a ressecção cirúrgica é o tratamento mais eficaz, porém entre 30% a 70% dos indivíduos que tiveram uma ressecção completa apresentaram reincidência do câncer. Sendo assim, juntamente com a cirurgia, a quimioterapia é o tratamento adjuvante padrão em pacientes com ressecção completa nos estágios iniciais (Felip *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2023).

Contudo, cerca de 70% dos pacientes já apresentam avanço local ou metástase no momento do diagnóstico. Para esses casos, a radioterapia, quimioterapia e a radioterapia combinada com a quimioterapia são utilizadas para o tratamento (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015; Molina *et al.*, 2008; Pritchard; Anthony, 1996).

Ainda para os casos avançados, há como opção de tratamento a imunoterapia, que consiste na potencialização do sistema imune para eliminar as células malignas. Ela pode ser utilizada em combinação com a quimioterapia, combinação com outras imunoterapias ou como monoterapia (Shafique; Tanvetyanon, 2019; Shields; Marin-Acevedo; Pellini, 2021; Zhang, Y.; Zhang, Z., 2020).

A radioterapia é um procedimento que pode ser utilizado como tratamento paliativo ou de cura em qualquer estágio do câncer de pulmão por meio do emprego da radiação ionizante, que danifica o DNA resultando em morte celular (Baskar *et al.*, 2012; Vinod; Hau, 2020). Já a quimioterapia, é o método de tratamento que utiliza componentes ou drogas tóxicas, que levam a morte das células tumorais (Anand *et al.*, 2023).

Os quimioterápicos agem nos processos biológicos relacionados à divisão celular, por meio da indução de danos ao DNA, que acionam as vias de morte celular, e pela inibição direta da progressão mitótica das células neoplásicas. Entre as classes de quimioterápicos utilizados, estão os agentes alquilantes e análogos da platina, que induzem ligações cruzadas em inter ou intra fitas de DNA, causando a quebra; antimetabólitos, que inibem a síntese de DNA e RNA; inibidores da topoisomerase, que bloqueiam as enzimas de desenrolamento do DNA, e agentes anti-microtúbulos que agem na tubulina, impedindo a formação do fuso mitótico e a divisão celular (Tilsed *et al.*, 2022).

Apesar de, inicialmente, os cânceres serem suscetíveis à quimioterapia, ao decorrer do tratamento pode ocorrer o desenvolvimento de resistência às drogas utilizadas, causada pelos mecanismos de inativação da droga, alteração do alvo do medicamento, efluxo da droga, inibição da morte celular, reparo dos danos ao DNA. A resistência somada ao fato de que quimioterápicos causam efeitos colaterais e ao alto custo do tratamento, levam à procura de compostos naturais

com atividade antitumoral. Dentre eles, estão os óleos essenciais (OE) (Almeida *et al.*, 2005; Blowmann *et al.*, 2018; Housman *et al.*, 2014).

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os OEs são metabólitos secundários produzidos pelas plantas aromáticas para proteção contra pestes e predadores, atração de polinizadores para dispersão de pólenes e sementes. Eles são armazenados em células oleíferas, ductos secretores, tricomas glandulares e podem ser encontrados e extraídos em diversos locais da planta, como raízes, galhos, folhas, flores, frutos, sementes, cascas (Bakkali *et al.*, 2008; Mugao *et al.*, 2020; Samarth, R.; Samarth, M.; Matsumoto, 2017).

São compostos complexos, lipofílicos, muito voláteis, e com forte aroma, constituídos por sesquiterpenos, diterpenos, terpenóides como álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, fenilpropanóides (arilpropanóides), e por monoterpenos, sendo o principal constituinte dos OEs. Os OEs podem conter de 20 a 60 constituintes em várias concentrações, e são divididos em compostos majoritários que representam de 20-95% do OE, compostos secundários (1-20%) e compostos vestigiais, representando menos de 1% do OE (Bakkali *et al.*, 2008; Blowmann *et al.*, 2018; Russo *et al.*, 2015; Sarkic; Stappen, 2018).

A composição química e a qualidade dos OEs podem variar devido a vários fatores, como o número e tipo de moléculas, estereoquímica dos constituintes e o processo de extração utilizado. Outros fatores, como o clima, época da colheita, intensidade luminosa, composição do solo e fase do ciclo vegetativo, também podem alterar a qualidade, quantidade e composição dos produtos extraídos (De Sousa *et al.*, 2023). Apesar da existência de inúmeros métodos de extração, a hidrodestilação é o método mais utilizado para obtenção do OE (Burt, 2004).

Geralmente, os compostos majoritários dos OEs são frequentemente responsáveis pela determinação das atividades biológicas, entretanto, os compostos minoritários também podem contribuir para a atividade, pois podem agir em sinergia entre si e/ou com os componentes majoritários, potencializando o efeito, todavia, cabe comentar que estes podem agir de forma antagônica (De Sousa *et al.*, 2023).

Dentre as atividades descritas para os OEs e/ou seus compostos componentes, encontra-se na literatura à atividade antioxidante, anti-nociceptivo, analgésico, antifúngico, antiviral, antibiótico, anti-inflamatório, antitumoral (Adorjan; Buchbauer, 2010; Mehdizadeh; Moghaddam, 2018; Russo *et al.*, 2015). O artigo de revisão de Bayala *et al.* (2014) traz uma compilação de estudos *in vitro* e *in vivo* que avaliaram a atividade antitumoral de diversos OEs. No Quadro 1, apresentam-se estudos *in vitro* em diversas linhagens tumorais.

Quadro 1 – Atividade antitumoral de diversos OEs em diferentes linhagens tumorais *in vitro*

(continua)

Câncer	Óleo essencial	Linhagem	Efeitos Biológicos
Glioblastoma	<i>Hypericum hircinum</i> ; <i>Ageratum conyzoides</i>	T98G (fibroblasto do cérebro) SF-763 (glioblastoma multiforme)	O OE mostrou um efeito antiproliferativo moderado em células T98G, com um $IC_{50} = 80,7 \pm 9,8 \mu\text{g/mL}$, e induziu apoptose. Atividade antiproliferativa do OE de <i>A. conyzoides</i> em células SF-763, com um $IC_{50} = 0,38 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$.
Mama	<i>Afrostryax lepidophyllus</i> ; <i>Scorodophloeus zenkeri</i> ; <i>Solanum erianthum</i>	MDA-MB 231 (adenocarcinoma das glândulas mamárias), Hs 578T (carcinoma ductal da mama)	Forte efeito citotóxico em células MDA-MB 231 (com um $IC_{50} = 10,09 \mu\text{g/mL}$ para o OE de <i>A. lepidophyllus</i> e $8 \mu\text{g/mL}$, para o OE de <i>S. zenkeri</i>). O OE volátil da folha de <i>S. erianthum</i> gerou morte celular em 98,86% das células Hs 578T na concentração de $250 \mu\text{g/mL}$.
Leucemia	<i>Malus domestica</i> ; <i>Croton regelianus</i>	THP-1 (monócito de leucemia monocítica aguda), HL-60 (promieloblasto de leucemia promielocítica)	Inibição de 65,7% das células THP-1 com o OE de <i>M. domestica</i> na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$. OE de <i>C. regelianus</i> apresentou citotoxicidade para as células HL-60, com $IC_{50} = 22,2 \mu\text{g/mL}$.

Quadro 1 – Atividade antitumoral de diversos OEs em diferentes linhagens tumorais *in vitro*

(conclusão)			
Fígado	<i>Thymus citriodorus</i> ; <i>Kadsura longipedunculata</i> ; <i>Curcuma wenyujin</i>	HepG2 (carcinoma de fígado)	OE de <i>T. citriodorus</i> apresentou efeitos tóxicos fortes em células HepG2, com um IC ₅₀ = 0,34% (v/v). <i>K. longipedunculata</i> apresentou efeito citotóxico, com um IC ₅₀ = 136,96 µg/mL. O OE de <i>C. wenyujin</i> apresentou efeito antiproliferativo de maneira dose-dependente em células HepG2, com um IC ₅₀ = 70 µg/mL, e induziu parada do ciclo nas fases S/G2.
Cólon	<i>Satureja khuzistanica</i> ; <i>Afrotyrax lepidophyllus</i> ; <i>Scorodophloeus zenkeri</i>	SW480 (adenocarcinoma colorretal), HCT116 (carcinoma colorretal)	O OE de <i>S. khuzistanica</i> reduziu a viabilidade das células SW480, com um IC ₅₀ de 62,5 µg/mL. Os OEs de <i>A. lepidophyllus</i> e <i>S. zenkeri</i> demonstraram um forte efeito antiproliferativo nas células HCT116, com um IC ₅₀ = 12,4 e 8,5 µg/mL, respectivamente.

Fonte: Adaptado de: BAYALA, B. *et al.* Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. **American Journal of Cancer Research**, v. 4, n. 6, p.591–607, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4266698/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

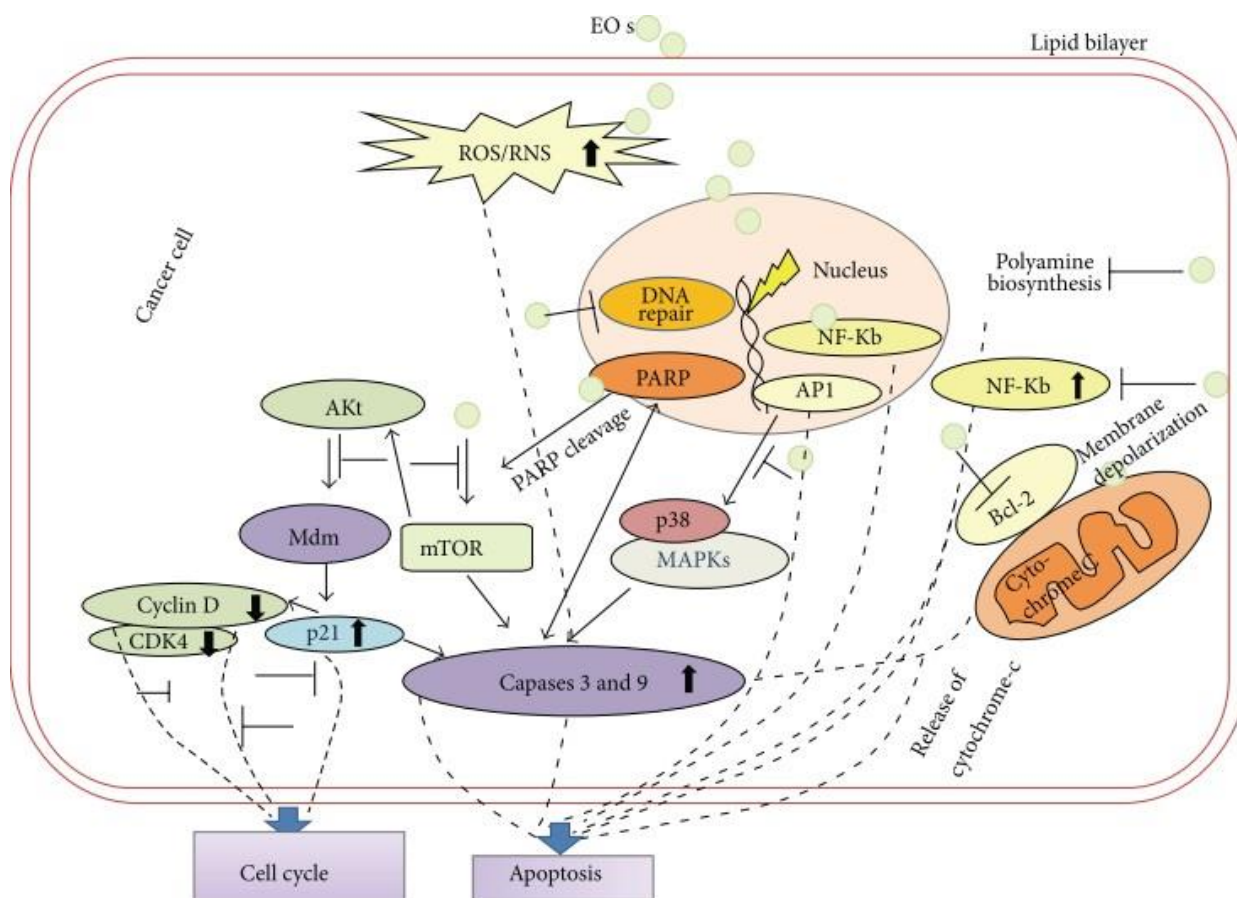
A respeito da atividade do OE em câncer de pulmão, o trabalho de El-Sawi, Motawae e Ali (2007) avaliaram a citotoxicidade do OE extraído das folhas e dos frutos de *Juniperus Phoenicea* em células tumorais de pulmão (linhagem H640) e observaram que os dois OEs exibiram alta citotoxicidade, porém o OE do fruto foi relativamente mais ativo para a linhagem H640. Zu *et al.* (2010) demonstraram a atividade de dez OE frente as células de adenocarcinoma de pulmão (linhagem A549), carcinoma de próstata (linhagem PC-3) e célula de câncer de mama (linhagem MCF-7), e constataram que o OE de tomilho apresentou maior citotoxicidade para as três linhagens (Zu *et al.*, 2010).

Os OEs da folha e do colmo de capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf), extraídos de diferentes regiões do Vietnã, foram analisados em diferentes linhagens de CPCNP (A549, NCI-H1975, NCI-H1650, NCI-H1299). O OE da folha

de Ha Loc exibiu os efeitos mais potentes sobre A549 e H1975, enquanto o da folha de Hy Cuong mostrou ser mais efetivo nas células H1299, e o OE do colmo de Kim Duc exerceu efeitos citotóxicos mais fortes contra H1650. O OE de Ha Loc induziu apoptose e parada do ciclo celular na fase Sub-G1 na linhagem A549 (Trang *et al.*, 2020).

O potencial anticancerígeno dos OEs está relacionado à capacidade de promoverem a parada do ciclo celular, induzir apoptose, ativar enzimas de desintoxicação, modular as vias de reparo do DNA, reduzir proliferação e metástase. Por serem permeáveis a membrana plasmática, podem atuar em diversos mecanismos das vias de sinalização, podem aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), que aumentam a ativação das caspases 3 e 9, induzindo a apoptose. Além disso, inibem mTOR e diminuem a fosforilação de AKT, que sucede o aumento da expressão de p21, a qual pode induzir o aumento das caspases 3 e 9, desencadeando apoptose, ou se ligar as ciclinas, causando a parada do ciclo celular. Também induzem estresse mitocondrial, ocasionando a diminuição da expressão da proteína Bcl-2 e despolarização da membrana, resultando na liberação do citocromo-c promovendo a morte celular por apoptose. Ainda, agem como inibidores da DNA polimerase e induzem a clivagem da enzima poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1), levando a apoptose (Figura 3) (Gautam; Mantha; Mittal, 2014).

Figura 3 - Mecanismos de ação envolvidos na atividade antitumoral dos OEs

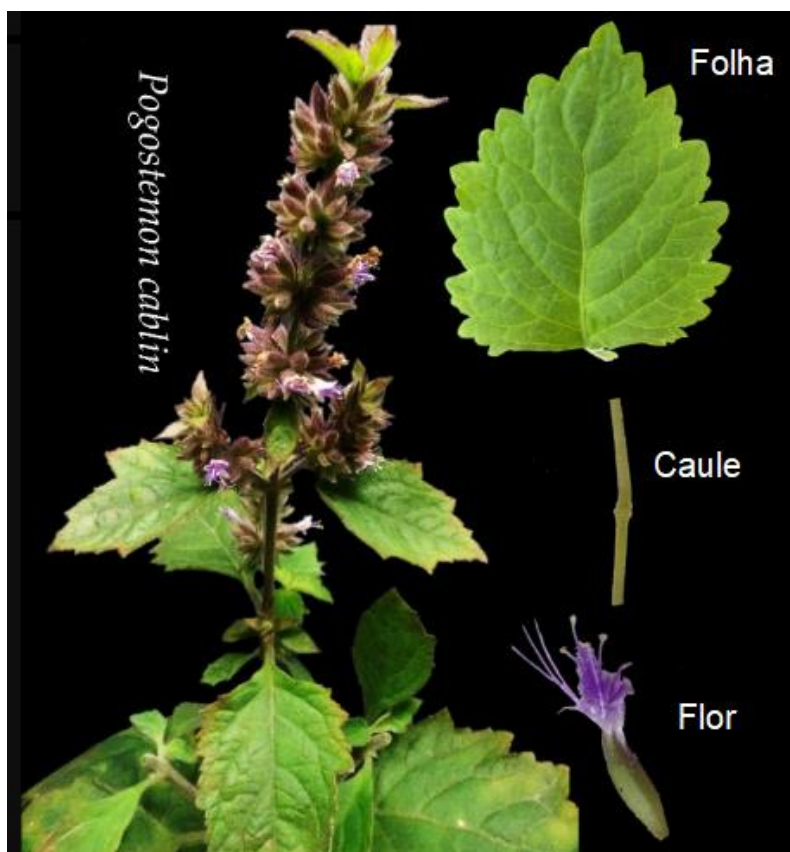


Fonte: Adaptado de: GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-23, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25003106/>. Acesso em: 22 jul. 2023.

3.4.1 Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth)

Pogostemon cablin Benth, popularmente conhecida como patchouli, é uma planta aromática nativa das Filipinas, pertencente à família Lamiaceae. É também cultivada na China, Singapura, Indonésia, Malásia, África ocidental e Vietnam. Morfologicamente, é descrita como uma erva perene que tem crescimento entre 1 e 1,2 metros, apresenta caule ereto. As folhas são simples, opostas e largas com margens lobadas e pelos na parte dorsal. As flores se apresentam em inflorescências do tipo espiga, com colorações que variam do branco ao roxo pálido (Figura 4) (Swamy; Sinniah, 2016a).

Figura 4 - *Pogostemon cablin* Benth



Fonte: Adaptado de: WANG, X. *et al.* GC-MS and UHPLC-QTOFMS-assisted identification of the differential metabolites and metabolic pathways in key tissues of *Pogostemon cablin*. **Frontiers in Plant Science**, v.14, p. 1-13, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1098280/full>. Acesso em: 23 fev. 2024.

O OE de patchouli é obtido a partir da destilação a vapor ou da hidrodestilação das folhas secas. Apresenta como característica um aroma agradável e duradouro, com um odor amadeirado, terroso e canforado e, além disso, contém propriedades fixadoras, que são utilizadas na indústria cosmética para produção de sabões, perfumes, loções corporais, detergentes (Beek; Joulain, 2017; Donelian *et al.*, 2009; Swamy; Sinniah, 2015b).

A composição do OE de patchouli é considerada complexa e única por ser constituído de uma grande proporção de diferentes sesquiterpenos, ao invés de uma mistura de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. O principal composto é o patchoulol, um sesquiterpeno oxigenado, mas também pode conter um grande número de outros hidrocarbonetos sesquiterpenos, como α -, β -, σ -patchoulenos, α -guaieno, seicheleno, α -bulneseno, e outros sesquiterpenos,

como *trans*- β -cariofileno, α -humuleno e γ -curcumenol (Deguerry *et al.*, 2006; Donelian *et al.*, 2009).

Além da indústria cosmética, o OE de patchouli e seus extratos, por serem liberados pela FDA (*Food and Drug administration*), também são comumente usados pela indústria alimentícia como aditivos em uma grande diversidade de alimentos, como bebidas alcoólicas e não alcoólicas, doces, produtos de panificação. Na aromaterapia, é utilizado para aliviar a depressão e o estresse, controlar o apetite, melhorar a libido, aprimorar a inteligência, reduzir a tensão, insônia e ansiedade, melhorar a concentração. Estudos demonstram que o OE de patchouli pode reduzir as respostas fisiológicas envolvidas no controle da pressão arterial, na pulsação, e nas ondas cerebrais (Muhammad *et al.*, 2022; Swamy; Sinniah, 2015).

Na medicina tradicional chinesa, é comumente utilizado no tratamento da dor abdominal, vômito, diarreia, dor de cabeça, resfriados, náusea, mordidas de insetos e cobras, síndrome externa, cansaço, remoção da umidade. Também é utilizado para aliviar o calor do verão e como estimulador de apetite (Swamy; Sinniah, 2015; Xu, M *et al.*, 2022; Yang, Lei., 2016).

Dada a variedade de substâncias químicas presentes em sua composição, inúmeros estudos acerca das propriedades farmacológicas do OE de patchouli foram realizadas. Esses estudos constataram as atividades anti-inflamatórias, antimicrobiana, antioxidante, analgésica, anti-hipertensivo, antidiabético, imunorregulador, antiviral, antifúngico, inseticida, antitrombótico, antisséptico, antimutagênico (Junren *et al.*, 2021; Kok *et al.*, 2023; Pandey *et al.*, 2022).

Relatos da atividade antitumoral do patchouli são mais recentes na literatura. O OE de patchouli, dentre os seis estudados por Sun *et al.* (2022), apresentou efeito citotóxico em linhagens de câncer de próstata (LNCaP) e melanoma (B16). De acordo com os autores, o composto majoritário, o patchoulol, presente neste óleo, talvez possa ser o principal responsável pela atividade antitumoral.

A atividade de seu extrato também é descrita. Chien *et al.* (2020) demonstraram, em estudo *in vitro* e *in vivo*, que o extrato de patchouli possui potente atividade antitumoral em células de câncer colorretal (linhagens HT-29 e CT26). No estudo *in vitro*, os autores observaram que o OE induziu apoptose por

meio do aumento dos níveis de Bax, caspases 3, 8 e 9 e Fas; promoveu parada do ciclo celular na fase G0/G1 pelo aumento da expressão de p53, p21 e diminuição da expressão das CDKs. Este estudo *in vivo* também revelou que o extrato de patchouli induz a apoptose, todavia sem mudanças significativas no peso e histologia do órgão.

Tsai *et al.* (2015) demonstraram que o extrato aquoso do OE de patchouli inibiu a proliferação, gerou parada do ciclo celular na fase G0/G1 e induziu apoptose em células de câncer de endométrio (linhagem Ishikawa). Os mecanismos envolvidos na indução de apoptose foram a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, aumento da atividade da caspase 3.

Com relação à eficácia do OE no tratamento do câncer de pulmão, a pesquisa de Lu *et al.* (2016) demonstraram que o patchoulol induziu parada do ciclo celular e apoptose em células de CPCNP (linhagem A549) *in vitro* e *in vivo*. Por meio da inibição da fosforilação de EGFR e de sua via *downstream*, e da fosforilação da via de sinalização de JNK, o patchoulol induziu a perda do potencial da membrana mitocondrial, causando alteração na razão Bcl-2/Bax, que culminou na liberação do citocromo c e ativação das caspases 3 e 9, levando à morte por apoptose.

Liang *et al.* (2023) observaram que o patchoulol induziu a parada do ciclo celular nas fases G0/G1 e apoptose em células CPCNP resistentes à vincristina (linhagem A549/V16). O patchoulol aumentou os níveis de EROs intracelular, desencadeando danos oxidativos ao DNA e, conseqüentemente, ativando as vias de sinalização ATM/CHK1 e ATM/CHK2, aumentando expressão de p53 e p21, levando à apoptose e parada do ciclo celular. Também demonstraram que o patchoulol induziu apoptose pela ativação intrínseca da via Bax/caspase-9/caspase-3. Além disso, ele atenuou a resistência à droga pela redução da expressão da glicoproteína-p.

O efeito antitumoral da fase vapor dos OEs já foi descrito na literatura pelo estudo pioneiro de Seal *et al.* (2012), que demonstrou que o vapor do OE da semente de *Litsea cubeba* induziu apoptose e causou parada do ciclo celular em células tumorais de pulmão (linhagem A549). No entanto, ainda não se encontram estudos referentes ao efeito antitumoral da fase vapor do OE de patchouli.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÓLEO ESSENCIAL

O OE de Patchouli, proveniente da Indonésia e extraído por destilação a vapor das folhas da espécie *Pogostemon cablin* foi adquirido da empresa Quinári, situada na cidade de Ponta Grossa, Paraná. A partir do cálculo da densidade do OE (900 mg/mL^{-1}), foi preparada uma solução mãe a 100 mg/mL^{-1} . O OE foi solubilizado em solução veículo constituído por etanol PA na proporção de 75% e propilenoglicol na proporção de 25%. Posteriormente utilizou-se salina (NaCl 0,9%) para realizar as diluições e obter as concentrações do OE testadas.

O parecer técnico do OE de patchouli foi disponibilizado pela empresa e está disponível no anexo A. Consta no laudo a composição química do OE, obtida por cromatografia gasosa de alta resolução, tendo como compostos majoritários o patchoulol (31,9%), α -bulnesceno (19,5%), seicheleno (14,3%) e α -patchouleno (8,6%).

Conforme a *International Organization for Standardization* (ISO), que padroniza a qualidade dos OEs, o OE de patchouli apresentou composição e percentual de patchoulol dentro dos estabelecidos (27-35%), da mesma forma que o α -bulnesceno (13-21%) (ISO, 2002). Baseado na literatura, pesquisas adicionais já demonstraram também que os principais compostos identificados no presente OE são majoritários em sua composição, embora se apresentem em diferentes proporções. Dentre eles, o α -patchouleno, seicheleno, se destacam por estar em maior concentração nesse estudo (Galovičová *et al.*, 2022; Sundaresan *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2019).

4.2 CULTIVO DAS LINHAGENS E TRATAMENTO

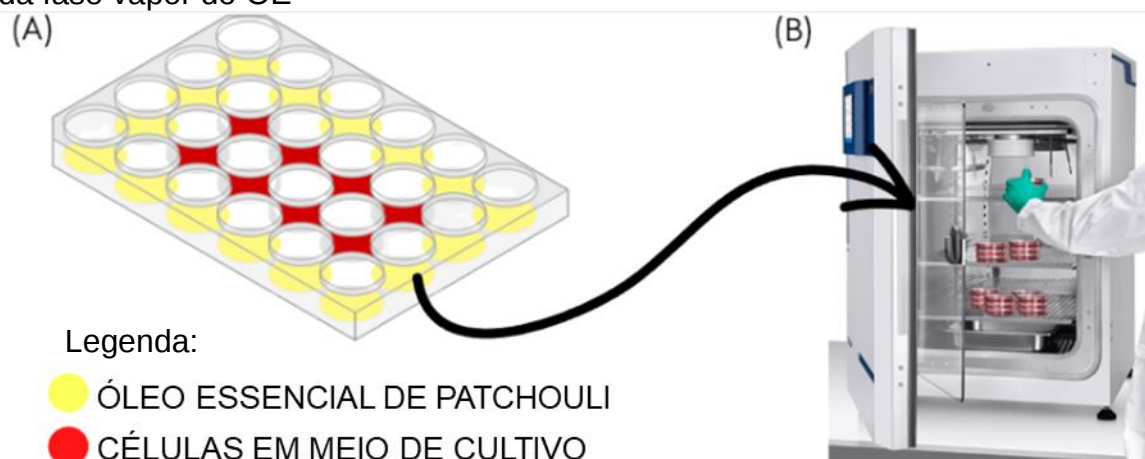
Proveniente do tecido pulmonar, a célula epitelial de carcinoma de pulmão humano denominada de linhagem celular A549, foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem H292, derivada de uma metástase do nó cervical de carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano, e a linhagem MRC-5, fibroblastos de pulmão humano, foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz. As

linhagens foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco), 2mM de L-glutamina (Vetec), 1mM de piruvato de sódio (Sigma Aldrich), 2g/L de bicarbonato de sódio (Vetec) e 1 mL/L de antibiótico penicilina e estreptomicina - 100 U/mL e 10 mg/mL (Sigma Aldrich), respectivamente. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

4.2.1 Tratamento

Para avaliação da fase vapor do OE, foi utilizada a estratégia metodológica descrita por Seal *et al.* (2012), com modificações. As células foram semeadas na concentração de 1×10^4 células/poço nos oito poços centrais de placas de 24 poços, as quais foram mantidas em incubadora por 24 h para total adesão celular. Nos 16 poços desprovidos de células, adicionou-se 1000 µL do OE diluído em solução salina (NaCl 0,9%) em diferentes concentrações: 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/mL/poço (Figura 5).

Figura 5 - Ilustração da estratégia experimental para avaliação da citotoxicidade da fase vapor do OE



(A) Em oito poços das extremidades centrais internas demarcados em vermelho, foram adicionados 1000 µL de células em meio de cultivo na concentração de 1×10^4 células/mL. Nos 16 poços externos restantes representados em amarelo, foram pipetados 1000µL da solução do óleo essencial nas concentrações de 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL⁻¹ em salina, 25% de propilenoglicol e 75% de etanol PA. (B) As placas foram mantidas em estufa por 72 horas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Fonte: A autora.

Cada placa recebeu o tratamento em apenas uma concentração, da mesma forma que os controles foram feitos em uma placa separada/isolada. Foram feitos dois controles negativos, o primeiro contendo apenas salina (apenas para os ensaios de citotoxicidade), e o segundo contendo salina + solução veículo. Após, as placas foram mantidas em estufa por 72h a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

4.3 ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

4.3.1 Redução do 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MTT)

O ensaio colorimétrico de MTT tem como finalidade avaliar a viabilidade celular por meio de sua redução. O anel tetrazólio do MTT é clivado em mitocôndrias ativas por meio da enzima tetrazólio-succinato-desidrogenase, obtendo como produto os cristais de formazan de coloração roxa. A quantidade de formazan formado é proporcional à atividade metabólica da célula (Mosmann *et al.*, 1983).

Após o período de tratamento, o meio foi retirado e adicionou-se 400 µL de solução de MTT a 0,5 mg/mL (Sigma Aldrich), segundo metodologia descrita por Mosmann *et al.* (1983), e foram incubadas por duas horas para visualização dos cristais de formazan. Em seguida, retirou-se a solução de MTT e adicionou-se 200 µL de dimetilsufóxido (DMSO) para a solubilização dos cristais. A solução foi homogeneizada e 100 µL foram transferidos para uma placa de 96 poços para a realização da leitura da absorbância no espectrofotômetro (Biotek, µQuant) a 550 nm. A viabilidade celular em porcentagem (%) foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorbância\ das\ células\ tratadas}{Absorbância\ média\ do\ controle} \times 100.$$

4.3.2 Coloração de proteínas utilizando-se sulforodamina B

Outro método utilizado para avaliar a viabilidade celular é o ensaio colorimétrico com emprego da sulforodamina B. Esse ensaio baseia-se na capacidade de ligação da sulforodamina B (SRB) nas proteínas celulares. A SRB é um corante aminoxanteno rosa brilhante que apresenta dois grupos sulfônicos, que se ligam a resíduos básicos em condições levemente ácidas e se dissociam em condições básicas. Pela ligação do corante ser estequiométrica, a quantidade de corante extraído das células é diretamente proporcional à massa celular (Vichai; Kirtikara, 2006).

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Papazisis *et al.* (1997), com modificações. Finalizado o tratamento, o meio foi retirado e as células foram lavadas com 200 µL de tampão salino-fosfato (PBS) pH 7,4. Posteriormente, adicionou-se 150 µL de ácido tricloroacético a 10% e as placas foram levadas a geladeira por meia hora. Após, as placas foram lavadas com água destilada e deixadas para secar por 24 horas. Logo depois, 100 µL de solução de SRB a 2% foram adicionados e, após 30 minutos as placas foram lavadas com ácido acético a 1%. Passadas 24 horas, foram pipetados 150 µL de TrisBase 10 mM para solubilização do corante. O conteúdo foi homogeneizado e 100 µL foram transferidos para uma placa de 96 poços para realização da leitura da absorbância nos comprimentos de 492 nm e 620 nm no espectrofotômetro (Biotek, µQuant). Foi realizada a normalização dos dados por meio da subtração do valor de 492 nm pelo valor de 620 nm e, em seguida foi calculada a viabilidade celular (%) conforme descrito na equação abaixo:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorbância\ 492\ nm - Absorbância\ 620\ nm}{Absorbância\ média\ do\ controle} \times 100$$

* Os dados do controle foram normalizados após subtração do valor da absorbância de 492 nm pelo valor de 620 nm.

4.3.3 Ensaio de viabilidade celular tempo-dependente em células A549

Com o objetivo de investigar se a resposta das células A549 ao tratamento com a fase vapor do OE patchouli variam ao longo do tempo, foram realizados ensaios de viabilidade celular em diferentes intervalos. Para tanto, as células foram semeadas numa concentração de 1×10^4 células/poço nos oito poços das placas de 24 poços e mantidas em estufa por 24 horas para adesão. Após, foram tratadas com o vapor do OE de patchouli na concentração de 170 $\mu\text{g/mL}$, concentração próxima ao ICV_{50} pelos períodos de 24, 48 e 72h.

Cada placa recebeu o tratamento em apenas uma concentração, da mesma forma que o controle foi feito em uma placa separada/isolada. Após os tratamentos, foram realizados os testes de viabilidade descritos nos itens 4.3.1 e 4.3.2.

4.3.4 Cálculo do ICV_{50} e do índice de seletividade (IS)

Com finalidade de calcular a concentração do OE capaz de gerar vapor suficiente para reduzir a viabilidade celular em 50% (ICV_{50}), os resultados obtidos da viabilidade celular dos itens 4.3.1 e 4.3.2 foram utilizados para o cálculo do ICV_{50} por meio da análise de regressão não linear pelo log das doses do OE, utilizando o *Software* GraphPad Prism 5.01.

Dentro do processo de avaliação de um produto natural como possível antitumoral, um parâmetro importante a ser avaliado é o índice de seletividade (IS) do produto, que tem finalidade de indicar o potencial uso deste composto em testes clínicos posteriores (Suffness; Pezzuto, 1991). Para avaliar a seletividade da fase vapor do OE de patchouli, foi realizado o cálculo do IS por meio da razão entre os valores de ICV_{50} da linhagem não tumoral (linhagem MRC-5) e os valores de ICV_{50} das linhagens tumorais (linhagens A549 e H292), sendo expressa na equação abaixo, onde valores menores que dois indicam não seletividade (Ayesh; Abed; Faris, 2014).

$$IS = \frac{\text{ICv50 células não tumorais}}{\text{ICv50 células tumorais}}$$

4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS A549 PELO ENSAIO DE FECHAMENTO DE FENDA

O ensaio de fechamento de fenda, também denominado de ranhura ou do inglês, *Scratch assay*, se baseia no monitoramento do crescimento de células em monocamada a partir da formação de uma zona livre de células no centro da superfície dos poços das placas em que estão aderidas até a recolonização da zona livre para quantificação da migração celular (Liang; Park; Guan, 2007).

A célula A549 foi semeada na concentração de $2,5 \times 10^5$ nos quatro poços centrais das placas de 24 poços e mantidas em estufa por 24 horas para total adesão. Posteriormente, as placas foram riscadas com uma ponteira de 200 μL em único sentido, passando pelo centro de cada poço. Em seguida, o meio foi retirado e os poços foram lavados com 500 μL de PBS para retirada do excesso de conteúdo celular e o meio suplementado com SFB foi recolocado. Após, as células foram submetidas ao tratamento utilizando o valor próximo a ICV_{50} , 170 $\mu\text{g/mL}$, pelo período de 24 horas. Logo após, o sobrenadante foi retirado e acrescentou-se 200 μL de corante Rosenfeld sobre as células por dois minutos. A seguir, foram pipetados 400 μL de água destilada fervida por oito minutos. Decorrido o tempo, as placas foram lavadas com água corrente para retirada do excesso de corante e deixadas para secar em temperatura ambiente por 24 horas.

A observação da proliferação e migração celular foi visualizada por meio do microscópio Olympus. Para quantificação da taxa de migração, foram feitos dois registros fotográficos, um após a realização do risco e outro após o período de tratamento e coloração. Esses registros foram analisados utilizando o *software* ImageJ 1.51s (National Institutes of Health, Maryland, EUA). A determinação da taxa de migração celular (%) foi calculada a partir da medição da área de crescimento após a realização do risco (período 0) e após tratamento, mostrada na equação abaixo:

$$\text{Migração (\%)} = \frac{\text{Área média período 0} - \text{Área média período de 24 horas}}{\text{Área média período 0}} \times 100$$

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FASE VAPOR DO OE NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

Para avaliar se a fase vapor do OE de patchouli gerou parada do ciclo celular foi realizada a citometria de fluxo de acordo com a metodologia descrita por Crissman e Steinkamp (1973) e Krishan (1975), com modificações. As células A549 foram semeadas na concentração de 1×10^5 por poço nos oito poços centrais da placa de 24 poços, e mantidas em estufa por 24h para total adesão celular. Após, as células foram tratadas por 24h com o vapor do OE de patchouli nas concentrações de 0; 85; 127,5; 170 e 340 $\mu\text{g/mL}$.

Decorrido o tratamento, as células foram tripsinizadas e neutralizadas com meio RPMI-1640. Subsequentemente, foram reunidos o conteúdo de dois poços em um tubo tipo eppendorf, centrifugados por sete minutos a 2000 rpm. Em seguida, o meio foi descartado e o *pellet* foi resuspendido em 200 μL de uma solução tampão de PSSI (10 μL de Triton X-100 a 0,1%, 10 μL de RNase (100 mg/mL), 50 μL de iodeto de propídeo (10 mg/mL) e 9,930 de PBS) por 18h. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio e foram adicionados 200 μL de PBS, e em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa Diva (Becton & Dickison), avaliando uma média de 100.000 eventos por amostra.

Em uma placa separada, foi realizado um controle negativo contendo apenas solução salina (NaCl 0,9%). Após o processo de centrifugação, o *pellet* foi resuspendido em 200 μL de solução de PSSI por 18 h.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o *Software* GraphPadPrism, versão 5.01 (San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os grupos experimentais foram testadas por meio do emprego da análise de variância (ANOVA *one-way*), seguido pelo teste de Post-Hoc de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média.

A concentração do OE capaz de gerar vapor suficiente para reduzir a viabilidade celular em 50% (ICV₅₀) utilizada para avaliar a citotoxicidade foi calculada empregando-se a análise de regressão não linear pelo log das doses do OE, utilizando o *Software* GraphPad Prism 5.01.

Os dados quantitativos do ensaio de migração celular obtido por meio do método do *Scratch assay* dos grupos experimentais foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FASE VAPOR DO OE DE PATCHOULI NA VIABILIDADE CELULAR

5.1.1 Linhagens tumorais A549 e H292

Os efeitos obtidos da fase vapor do OE de patchouli sobre a viabilidade celular das linhagens A549 e H292 foram avaliados empregando-se os métodos de redução de MTT e coloração de SRB. A responsividade das linhagens ao tratamento está expressa na Figura 6. É possível observar que a fase vapor do OE gerou uma redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle, a partir da concentração de 62,5 µg/mL, efeito observado para ambos os ensaios, de MTT e de SRB. Além disso, foi observada diferença significativa entre o veículo e controle, o que pode ser explicado pela capacidade do propilenoglicol de diminuir a viabilidade celular e inibir a proliferação em células epiteliais da via respiratória, conforme relatado por Komura *et al.* (2022).

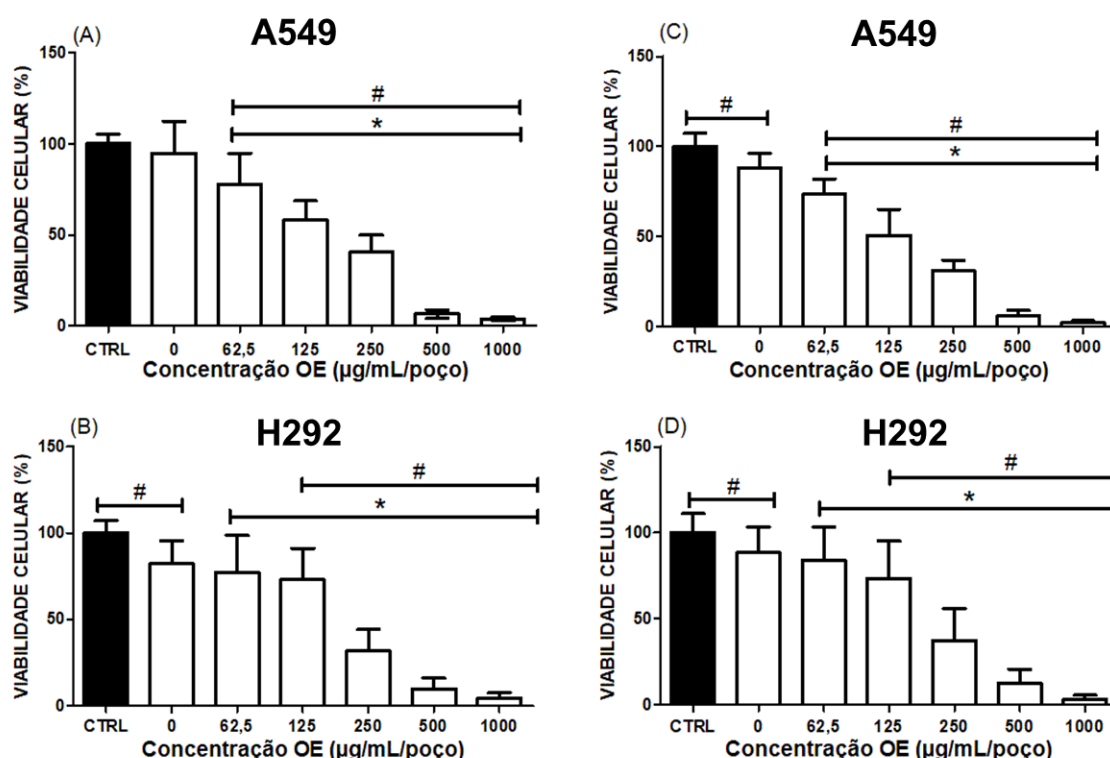
Com base nos resultados obtidos, foi calculada a concentração do OE capaz de gerar vapor suficiente para reduzir a viabilidade celular em 50% (ICV₅₀), expressa em µg/mL/poço no período de 72 horas (Tabela 1).

Tabela 1- Valores do ICV₅₀ para as linhagens A549 e H292 após tratamento com o vapor do OE de patchouli

	A549		H292	
	MTT	SRB	MTT	SRB
72h	169,74 ± 29,04	156,13 ± 27,91	215 ± 45,86	220,74 ± 57,96

Os valores de ICV₅₀ (µg/mL/poço) são expressos como média ± desvio padrão obtidos a partir dos experimentos de 72h de tratamento com a fase vapor do OE de patchouli. Os valores foram calculados por regressão não linear pelo log das doses do OE utilizando o *Software* GraphPad Prism 5.01.

Figura 6- Efeito da fase vapor do OE de patchouli em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular das linhagens A549 e H292



Viabilidade celular (%) determinada pelos ensaios de redução de MTT (A, B) e coloração com SRB (C, D), respectivamente após 72 h de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão, obtidos de no mínimo três ensaios independentes com $n = 4$. Os símbolos * representam a diferença estatística, obtida por *One-Way ANOVA*, seguida pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em relação ao controle (salina) e # representam diferença estatística em relação ao veículo (propilenoglicol e etanol 25:75 + salina 0,9%) representado no gráfico pela concentração de 0 µg/mL.

A partir dos dados apresentados na Figura 6 e Tabela 1, é possível observar que, das linhagens tumorais testadas, a H292 apresentou maior resistência ao tratamento com o vapor do OE de patchouli quando comparado à linhagem A549, fato corroborado por meio do valor de ICV_{50} , o qual foi maior, tanto para o ensaio de MTT, quanto para o de SRB.

A linhagem H292, que foi menos responsiva ao tratamento com o vapor do OE de patchouli, é um subtipo raro de CPCNP, correspondendo a menos de 0,5% de todos os carcinomas pulmonares (Roden *et al.*, 2014). Devido à ineficiência da quimioterapia e radioterapia, a ressecção cirúrgica é a principal forma de tratamento para este tipo de câncer (XI *et al.*, 2012).

Em estudo de Sakamoto *et al.* (2015), foi quantificada a expressão de proteínas transportadoras de drogas em cinco linhagens tumorais de pulmão. Dentre elas, a linhagem H292 não apresentou a glicoproteína-P, classificada

como uma das proteínas transportadoras de membrana pertencentes à família ABC (cassete de ligação a ATP), responsáveis pelo efluxo de compostos tóxicos e drogas presentes nas células, que resultam na resistência às drogas.

Galetti *et al.* (2015) constataram que a linhagem também não expressa a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP ou ABCBG2), pertencente também à família ABC, e, conseqüentemente, foi mais sensível ao tratamento com Gefitinib.

Com base na literatura, a menor responsividade da linhagem H292 observada neste estudo pode não estar diretamente associada à expressão dessas proteínas de resistência, mas possivelmente a outros mecanismos subjacentes. A exemplo, a indução da superexpressão da proteína FoxM1 (*Forkhead box M1*), membro da família de fatores de transcrição Forkhead, que desempenha papel importante no ciclo celular, controlando a transição da fase G1 para a fase S e entrada e conclusão da mitose, em células H292 aumentou a resistência ao tratamento com Gefitinib (Xu *et al.*, 2012).

Todavia, a linhagem A549, responsável por aproximadamente 40% de todos os carcinomas pulmonares, também apresenta uma grande refratariedade aos quimioterápicos e à radioterapia (Denisenko; Budkevich, Zhivotvsky, 2018). Diferentemente da linhagem H292, a menor responsividade dessa linhagem ao tratamento está associada à expressão de proteínas que causam resistência as múltiplas drogas, pois foi evidenciado que as células A549 apresentam o gene MDR1 (*Multidrug Resistance -1*), também conhecido como ABCB1, que é responsável pela expressão da glicoproteína-P (Li, A. *et al.*, 2016; Sakamoto *et al.*, 2015). Além disso, foi averiguado em outro estudo que as células A549 também expressam a proteína BCRP, a qual atribuiu resistência ao Gefitinib (Galetti *et al.*, 2015).

Relatos sobre a atividade antitumoral do OE de patchouli em sua fase líquida são escassos na literatura. Dentre os seis OE testados por Sun *et al.* (2022), o OE de patchouli exibiu efeito inibitório em células de melanoma (BF-16) e câncer de próstata (LNCaP), com uma concentração inibitória de 50% (IC₅₀) de 109,32 ± 9,51 e 138,24 ± 13,74 µg/mL, respectivamente.

O potencial efeito antitumoral de seu composto majoritário, o patchoulol, também já foi relatado na literatura. De fato, Liang *et al.* (2023) avaliaram o efeito

do patchoulol, fase líquida, em células A549 e em A549 resistentes a vincristina, e demonstraram que houve redução da viabilidade celular, seguindo um perfil dose-dependente em culturas tratadas com patchoulol. Os autores calcularam o IC₅₀, respectivamente, como $107,84 \pm 0,67$ e $128,94 \pm 2,52$ μM no período de 24h de tratamento, e de $106,18 \pm 6,34$ μM e $125,52 \pm 2,92$ μM para o período de 48h.

Neste mesmo estudo, Liang *et al.* (2023) relataram ainda inibição da proliferação celular e parada do ciclo celular na fase G0/G1, gerados pelo aumento intracelular de EROs, que desencadearam danos oxidativos ao DNA e ativaram as vias ATM/CHK2 e ATR/CHK1, que resultaram na fosforilação da p53, causando o aumento da p21 e, consequentemente, a diminuição das proteínas CDK2 e ciclina E1, responsáveis pela progressão das células para a fase S do ciclo celular.

Esses autores também verificaram que houve indução de morte celular por apoptose, devido ao aumento da porcentagem de células na fase subG0, ocasionado pela diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, aumento da expressão da proteína pro-apoptótica Bax e caspases 3 e 9 clivadas (Liang *et al.*, 2023)

O patchoulol ainda atenuou a resistência às drogas, diminuindo a expressão da glicoproteína-P e dos marcadores de células tronco cancerígenas (CD44 e CD133), que desempenham importante papel na resistência as drogas, metástase e reincidência (Liang *et al.*, 2023; Zheng, Y *et al.*, 2022). Além disso, a combinação da cisplatina e patchoulol exibiu um efeito sinérgico inibitório em ambas as linhagens.

No trabalho de Lu *et al.* (2016), os autores descrevem que o patchoulol foi citotóxico frente à linhagem A549 de maneira tempo e concentração-dependente, com uma IC₅₀ de $79,80 \pm 4,09$ $\mu\text{g/mL}$ no período de 48h de tratamento. Os autores verificaram que houve morte por apoptose, atribuída à inibição da fosforilação da via da tirosina quinase EGFR, envolvida na gênese de vários cânceres e, ainda, fosforilação da via cinase c-Jun amino-terminal (JNK), responsável por gerar a despolarização de membrana mitocondrial, ocasionando o desequilíbrio das proteínas Bcl-2/Bax, causando a liberação do citocromo c e ativação das caspases 3 e 9. Também foi relatado pelos pesquisadores que o

patchoulol induziu parada do ciclo celular na fase G1/S, por meio da ativação da proteína p53 e p21 e inibição da CDK2 e ciclina E.

Em um estudo *in vivo* com camundongos BALB/C nude, foi demonstrado que, no grupo tratado com uma injeção intraperitoneal com patchoulol (5-15 mg/Kg), houve redução do tamanho do tumor de pulmão (linhagem A549) e também diminuição de Ki-67 positivo, e aumento das caspases 3 e 9, o que demonstra o efeito apoptótico e antiproliferativo do patchoulol (Lu *et al.*, 2016).

Em relação à atividade antitumoral, especificamente, da fase vapor dos OEs, pesquisas do grupo, como a de Nadal e Kanunfre (2019), demonstraram que o vapor do OE de patchouli reduziu a viabilidade das células A549 de maneira tempo e concentração-dependente, com uma ICV₅₀ calculada de 256,69 ± 37,99 µg/mL quando se empregou o ensaio de redução de MTT e 313,71 ± 44,18 µg/mL o de SRB para determinação da viabilidade celular no período de 72h de tratamento. Segundo o estudo de Maeda (2016), o vapor do OE de patchouli também diminuiu a viabilidade das células de adenocarcinoma de pulmão humano, linhagem Calu-3, com uma ICV₅₀ de 225 µg/mL.

Esses valores de ICV₅₀ são maiores quando comparados aos resultados obtidos nesta pesquisa, indicando que o vapor do OE de patchouli empregado neste estudo foi mais citotóxico. Neste sentido, cabe ressaltar que o OE utilizado pelas autoras citadas acima difere na composição química do utilizado nesse trabalho, o que poderia ser a explicar da diferença observada. Cabe comentar que fatores como clima, solo, localização geográfica da planta, o tipo e local de extração, variação genética, entre outros são capazes de alterar os constituintes dos OE e, por conseguinte, suas propriedades biológicas (Raut; Karuppayil, 2014).

5.1.2 Linhagem controle - MRC-5

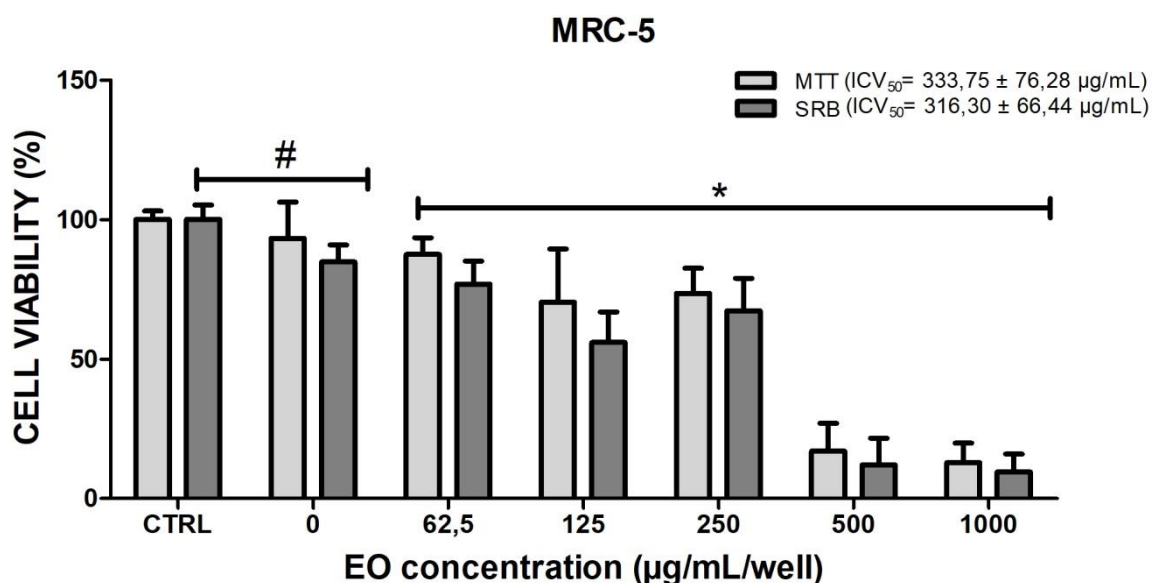
Com finalidade de avaliar se a fase vapor do OE de patchouli induz morte celular de maneira seletiva, a linhagem MRC-5 derivada de fibroblastos de pulmão humano, também foi submetida aos testes de viabilidade celular pelos ensaios de redução de MTT e coloração com SRB, após 72h de tratamento com a fase vapor do OE.

Cabe mencionar que, a partir dos resultados obtidos, pode-se evidenciar que a linhagem MRC-5 apresentou dois perfis de resposta ao tratamento, um mais refratário e outro mais sensível, sendo a concentração de 250 µg/mL limítrofe para a detecção do perfil.

Nos ensaios com o primeiro perfil de resposta, conforme apresentado na Figura 7, a fase vapor do OE gerou uma redução da viabilidade celular a partir da menor concentração, 62,5 µg/mL, tanto para o ensaio de redução de MTT quanto o de SRB. Assim como observado para as linhagens tumorais, houve diferença significativa da viabilidade entre o veículo e controle.

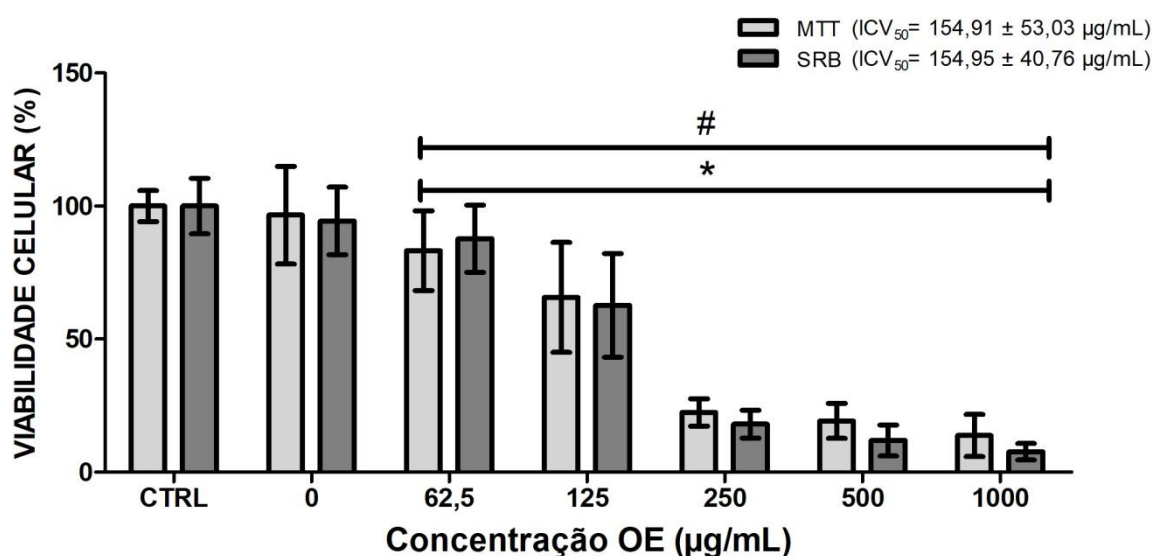
Com relação às células com perfil de resposta mais sensível, a fase vapor do OE também reduziu a viabilidade celular a partir da concentração de 62,5 µg/mL, para ambos os ensaios, de redução de MTT e SRB (Figura 8).

Figura 7 - Efeito da fase vapor do OE de patchouli sobre a linhagem MRC-5 com perfil de resposta mais refratário



Viabilidade celular (%) determinada pelos ensaios de redução de MTT e coloração com SRB após 72 h de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão, obtidos de cinco ensaios independentes com n= 4 por ensaio. Os símbolos * representam a diferença estatística, obtida por *One-Way ANOVA*, seguida pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em relação ao controle (salina) e # representam diferença estatística em relação ao veículo (propilenoglicol e etanol 25:75 + salina 0,9%) representado no gráfico pela concentração de 0 µg/mL.

Figura 8 - Efeito da fase vapor do OE de patchouli sobre a linhagem MRC-5 com perfil de resposta mais sensível



Viabilidade celular (%) determinada pelos ensaios de redução de MTT e coloração com SRB após 72 h de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão, obtidos de quatro ensaios independentes com $n = 4$ por ensaio. Os símbolos * representam a diferença estatística, obtida por *One-Way ANOVA*, seguida pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em relação ao controle (salina) e # representam diferença estatística em relação ao veículo (propilenoglicol e etanol 25:75 + salina 0,9%) representado no gráfico pela concentração de 0 $\mu\text{g/mL}$.

Baseado nos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade com a fase vapor do OE, foram calculados os valores de ICV_{50} , expressos em $\mu\text{g/mL/poço}$ no período de 72h (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de ICV_{50} para os dois perfis de resposta da linhagem MRC-5 após tratamento de 72h com o vapor do OE de patchouli

	MRC-5 Refratária		MRC-5 Sensível	
	ICV_{50}		ICV_{50}	
	MTT	SRB	MTT	SRB
72h	$333,75 \pm 76,28$	$316,30 \pm 66,44$	$154,91 \pm 53,03$	$154,95 \pm 40,76$

Os valores de ICV_{50} ($\mu\text{g/mL/poço}$) são expressos como média $\pm$ desvio padrão obtidos dos experimentos de 72h de tratamento com a fase vapor do OE de patchouli. Os valores foram calculados por regressão não linear pelo log das doses do OE utilizando o *Software GraphPad Prism 5.01*.

Comparando os ICV_{50} da linhagem MRC-5 com os ICV_{50} das linhagens tumorais A549 e H292, as células MRC-5 com o perfil refratário apresentaram

uma ICV_{50} maior que os das células tumorais, contrariamente, as de perfil mais sensível apresentaram valores menores, o que impacta diretamente no cálculo do índice de seletividade (IS).

O IS é calculado pela razão entre o valor da ICV_{50} da linhagem tumoral pelo valor da ICV_{50} da linhagem não tumoral. Valores menores que 2 (dois) indicam não seletivo (Ayesh; Abed; Faris, 2014). Conforme mostrado na Tabela 3, a fase vapor do OE de patchouli não é seletivo para células tumorais.

Tabela 3 – Valor do IS da fase vapor do OE de patchouli nos dois perfis de resposta da linhagem MRC-5 ao tratamento por 72h

MRC-5 Refratária			MRC-5 Sensível	
IS Fase vapor			IS Fase vapor	
72h	MTT	SRB	MTT	SRB
A549	1,96	2,02	0,91	0,99
H292	1,55	1,43	0,72	0,70

Os valores dos IS foram calculados pela razão entre o valor da ICV_{50} da linhagem tumoral pelo valor da ICV_{50} da linhagem não tumoral. Os valores menores que dois demonstraram uma seletividade não específica para a fase vapor do OE de patchouli.

As diferenças de resposta no ensaio de viabilidade observadas podem estar associadas ao uso da cultura celular em diferentes números de passagens. Em culturas com baixo número de passagens, o vapor do OE promoveu uma menor redução da viabilidade, portanto, as células foram mais refratárias. Já as com maior número de passagens, o OE demonstrou uma maior redução da viabilidade, evidenciando maior sensibilidade das células.

Essa observação é corroborada pelo estudo de Schäuble *et al.* (2012), que relataram que os marcadores de senescência para a linhagem MRC-5 já começam a aparecer em baixos números de passagens. A partir da 30ª passagem, foi possível observar um aumento da proteína p21, e, próximo a 40ª passagem, tem-se um acúmulo da enzima SA- β -gal (*β -galactosidase associada à senescência*) e da proteína p16. Já da 48ª passagem em diante, os pesquisadores relataram que há um aumento acentuado destas proteínas p16, p21 e SA- β -gal, e ainda com formação de focos de heterocromatina associados à

senescência (SAHF), domínios especializados da heterocromatina que contribuem para o silenciamento dos genes promotores da proliferação.

O tratamento das células MRC-5 normais e MRC-5 de senescência induzida pela doxorrubicina, em combinação com os antitumorais desatinibe e quercitina, reduziu a viabilidade celular em 49,5% para MRC-5 senescentes, enquanto para MRC-5 normais/não senescentes não houve uma redução da viabilidade de maneira significativa (De Godoy; Macedo; Gambero, 2024).

Portanto, a entrada na fase de senescência da linhagem MRC-5, poderia gerar diferentes respostas de citotoxicidade e, por conseguinte, nos valores de ICV_{50} calculados.

Outro aspecto a ser levado em consideração seria a capacidade de alguns marcadores de senescência alterarem a resposta citotóxica a um fármaco, entre eles, se destaca a proteína p21. No estudo de Ravizza *et al.* (2004), o aumento de p21 induzido pelo tempol (nitróxido de piperidina), quando empregado em diferentes linhagens de câncer de cólon, aumentou a sensibilidade ao tratamento com doxorrubicina, demonstrado por um menor valor de IC_{50} quando comparado ao controle/sem o uso do tempol.

Pensando-se no parênquima de tecido pulmonar normal, o número de células senescentes é baixo e, portanto, podemos assumir que os fibroblastos alveolares apresentariam o perfil de maior resistência ao OE. Todavia, quando utilizado esse valor de ICV_{50} para o cálculo do IS, obteve-se um valor próximo, porém inferior a 2 (dois), para ambas as linhagens.

Para entender melhor a seletividade do OE de patchouli frente às diferentes linhagens de câncer de pulmão, é de suma importância considerar pesquisas anteriores que investigaram seu efeito em condições semelhantes.

Especificamente, considerando o efeito da fase vapor do OE sobre a linhagem MRC-5, no mesmo estudo de Nadal e Kanunfre (2019) mencionado anteriormente, o ICV_{50} para a linhagem MRC-5 foi 794 $\mu\text{g/mL}$ para os ensaios de redução de MTT e de 718 $\mu\text{g/mL}$ para SRB, com um IS de 3,1 (MTT) e 2,1 (SRB) em relação à célula tumoral A549, mostrando que o vapor do OE possui uma seletividade-específica, diferente do que foi mostrado neste estudo. Cabe reiterar que os OEs de patchouli estudados apresentam diferenças de composição.

5.1.3 Viabilidade tempo-dependente da fase vapor do OE em células A549

No ensaio tempo-dependente, as células A549 foram submetidas ao tratamento com a concentração de vapor de OE de 170 µg/mL, pelos períodos de 24, 48 e 72h.

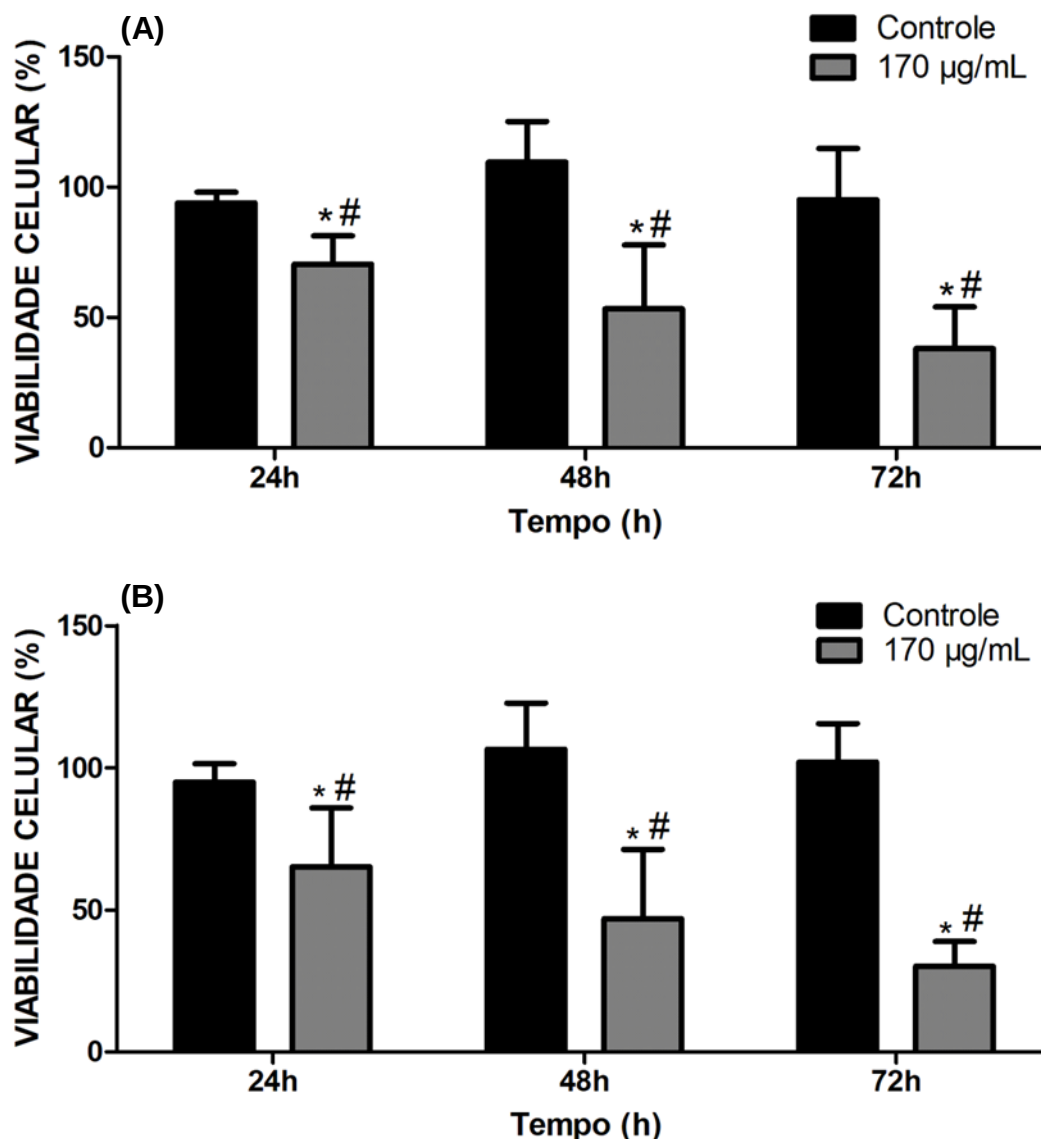
Na Figura 9, é possível observar que o vapor do OE de patchouli reduziu de maneira significativa à viabilidade celular nos períodos de tratamento de 24, 48 e 72h, em comparação ao controle, em ambos os ensaios, redução do MTT e coloração com SRB. O perfil de tempo-dependência também foi observado, uma vez que houve diferença estatística entre os valores de viabilidade obtidos entre os diferentes tempos.

No período de 24h, o vapor do OE causou uma diminuição na viabilidade de 29,85% e de 34,77% nos ensaios de redução de MTT e SRB, respectivamente. Já no período de 48h, a redução foi de 46,73% (MTT) e 53,07% (SRB). No tempo de 72h, a redução da viabilidade foi maior, com um valor de 61,96% empregando o ensaio de redução de MTT e 69,78% no ensaio de SRB.

Todavia, não é possível distinguir se a redução da viabilidade celular está relacionada ao efeito citostático ou citotóxico, uma vez que o ensaio de redução de MTT é um marcador que reflete o metabolismo das células viáveis e não especificamente a proliferação celular, sendo incapaz de diferenciar entre esses mecanismos de ação (Dragar; Kralj; Kocbek, 2021; Riss *et al.*, 2013; Sazonova *et al.*, 2022).

Ainda, referente ao ensaio de coloração com SRB, esse não permite a diferenciação direta entre células vivas e mortas, mas apenas representação da quantidade total de proteínas, com base no número de células aderidas, a qual é utilizada para mensurar as células vivas. Além disso, alguns fármacos podem alterar a capacidade de adesão celular sem necessariamente induzir morte celular (Adan; Kiraz; Baran, 2016; Papazisis *et al.*, 1997).

Figura 9 – Efeito da fase vapor do OE de patchouli sobre a viabilidade celular nos períodos de 24, 48 e 72h



Viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução de MTT (A) e coloração com SRB (B) após 24, 48 e 72h de tratamento. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão, obtidos de no mínimo três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. Os símbolos * representam a diferença estatística em relação ao controle (propilenoglicol e etanol 25:75 + salina 0,9%), obtida por ANOVA One-way seguida pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e # representam diferença entre todos os tempos de tratamento.

5.2 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO DE FECHAMENTO DE FENDA

A migração celular é o processo em que células se movimentam de um local para o outro e que faz parte de processos fisiopatológicas do organismo,

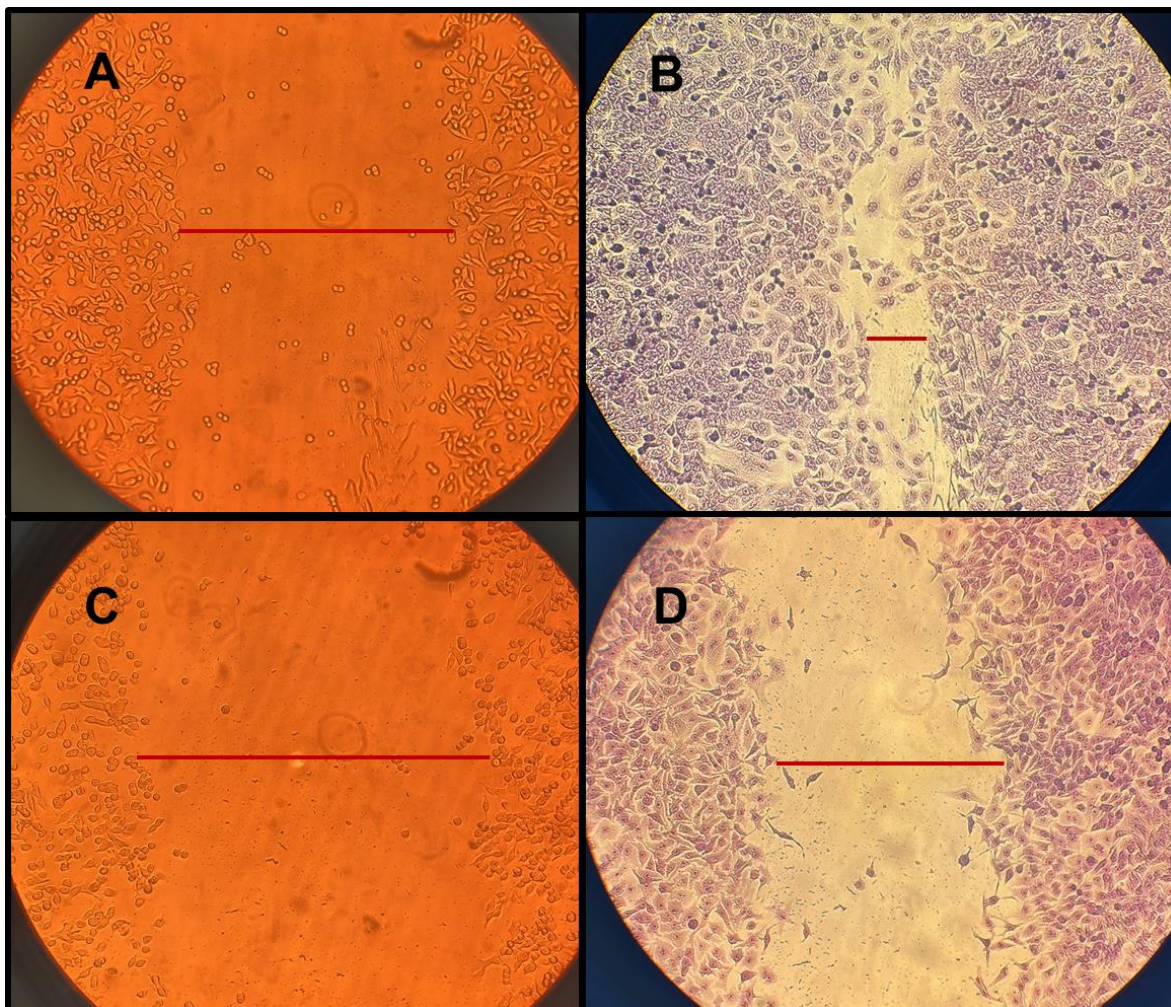
dentre as quais se destacam metástases-cânceres, inflamação e cicatrização de feridas (Hulkower; Herber, 2011).

As metodologias para quantificar a migração celular são ferramentas úteis para triagem de drogas anticâncer. Em um ensaio de migração celular, uma redução no fechamento da fenda gerada por uma ranhura na monocamada celular pode indicar que o composto possui atividade antitumoral (Menezes, 2011).

Para avaliar a capacidade de migração das células A549, foi utilizada a concentração de 170 µg/mL e o tempo de tratamento foi de 24 horas.

Nos resultados do ensaio de fechamento de fenda (Figura 10), foi possível observar que a fase vapor do OE de patchouli reduziu a migração das células A549 quando comparado ao controle, após tratamento por 24 horas.

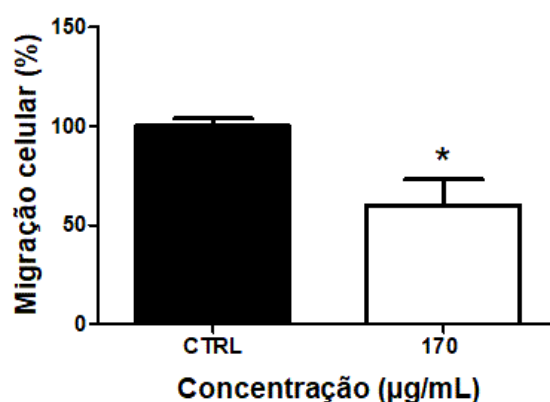
Figura 10 - Registro de imagem da microscopia óptica do efeito da fase vapor do OE de patchouli na migração celular da linhagem A549 tratada com a concentração do ICV₅₀



Em (A) e (B) estão apresentadas as imagens da microscopia óptica do ensaio de fechamento de fenda do controle no período 0 e após 24h de tratamento e coloração, respectivamente e em (C) e (D) estão apresentadas as imagens das células tratadas com o vapor do OE de patchouli no período 0 e após 24h, respectivamente. As linhas vermelhas indicam a área medida. Aumento de 200X.

Os dados representados pela Figura 11 indicam que o vapor do OE de patchouli reduziu em aproximadamente 40% a migração das células A549.

Figura 11 - Efeito da fase vapor do OE de patchouli sobre a migração celular na linhagem A549



A migração celular (%) foi determinada pelo ensaio de fechamento de fenda após tratamento pelo período de 72h. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão, com $n=4$. O símbolo * representa a diferença estatística em relação ao controle (propilenoglicol e etanol 25:75 + salina 0,9%), obtida pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Apesar da escassez de informações referente à inibição da migração celular pelo OE de patchouli na fase líquida, há na literatura relatos dos efeitos do seu composto majoritário, o patchoulol. O estudo de Song *et al.* (2021) mostrou que o patchoulol inibe a migração celular e a proliferação de tumor colorretal *in vitro*, sendo esse efeito atribuído a redução da expressão das metaloproteinases de matriz MMP2 e MMP9, envolvidas na invasão e proliferação tumoral.

O patchoulol também já foi relatado por demonstrar efeito na redução da migração e proliferação celular de melanoma de camundongos (*Mus musculus*) de maneira dose-dependente, por meio da redução das proteínas Smad2/3 fosforiladas (ativam ou suprimem a transcrição de genes), que resultaram no aumento da expressão de E-caderina e redução da expressão da vimentina. A E-caderina e vimentina são proteínas que estão envolvidas no processo de indução de células epiteliais para mesenquimal (EMT), que está relacionado a vários processos tumorais, dentre eles a migração e metástase. Além disso, os autores relataram que o patchoulol reduziu a expressão das proteínas MMP2 e MMP9 (Chang *et al.*, 2023).

O tratamento de células de câncer de próstata (linhagens PC-3 e DU145) com patchoulol diminuiu a invasão e migração celular de maneira dose-dependente, sendo observada a redução das proteínas MMP2, MMP7, MMP9, a

redução de VEGF, fator de crescimento endotelial vascular, a redução de N-caderina e o aumento de E-caderina, proteínas envolvidas no processo de EMT (Cai *et al.*, 2022).

Em relação à via de sinalização que regula a migração celular em células de câncer de pulmão, Petpiroon *et al.* (2019) revelaram que a supressão da caveolina-1 por silenciamento gênico via RNA de interferência (*shRNA-Cav-1-transfected*) em células H292 altera a expressão das integrinas $\beta 1$, $\beta 3$, e αv . Segundo os autores, tal depleção também acarretou em redução da ativação das proteínas FAK, AKT e CDC42 (*cell division cycle 42*), as quais são importantes para o mecanismo de formação de filopodia.

5.3 ANÁLISE DA FASE VAPOR DO OE DE PATCHOULI NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

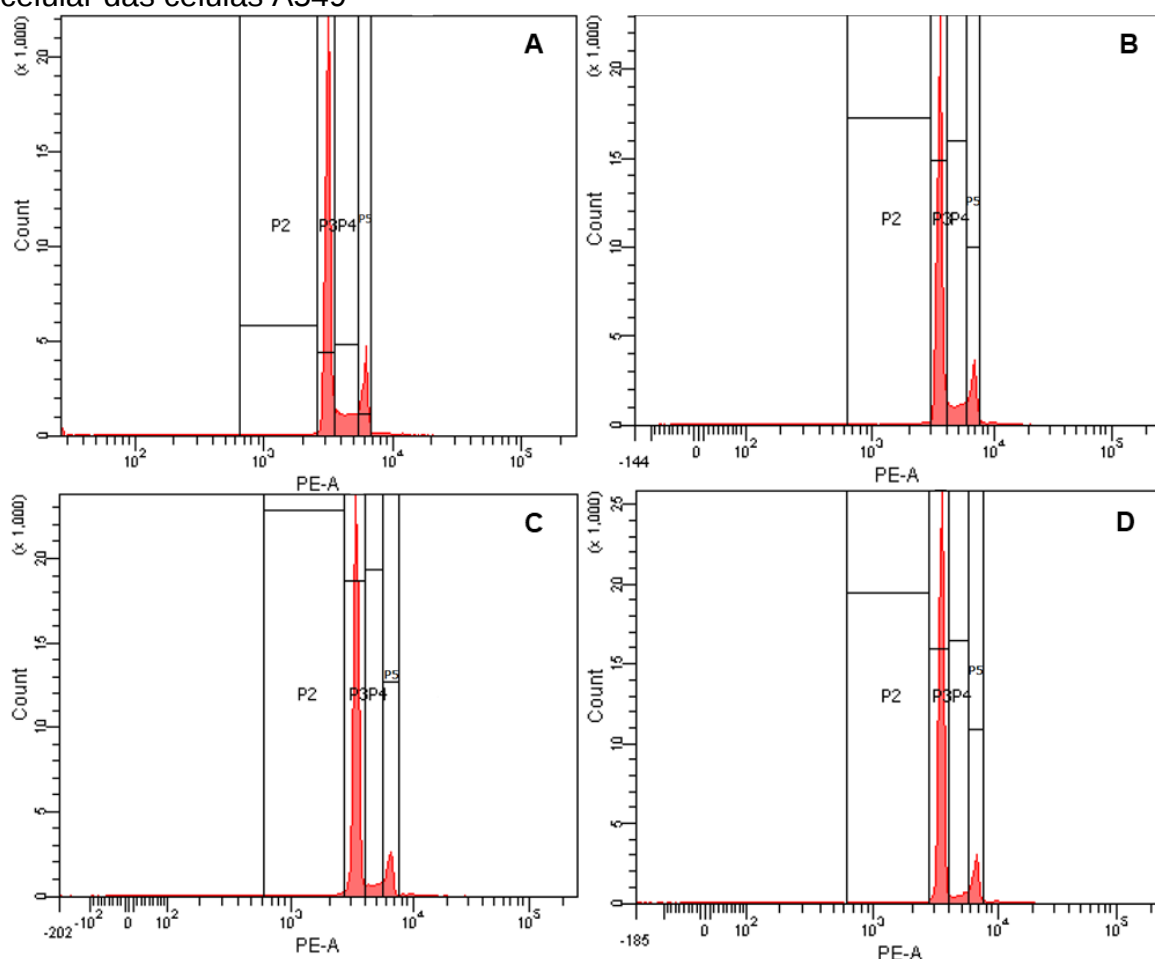
Devido à dificuldade de distinção e limitações dos ensaios de viabilidade empregados, é necessário utilizar uma combinação de diferentes metodologias a fim de compreender o efeito exercido pelo OE. Com essa finalidade, a análise de citometria de fluxo, utilizando o composto iodeto de propídeo (IP) como marcador, foi realizada para investigar se a fase vapor do OE de patchouli poderia alterar a distribuição das células A549 nas diferentes fases do ciclo celular.

Sabe-se que o IP se intercala entre as bases do DNA de maneira estequiométrica, onde a emissão de fluorescência é proporcional ao teor de DNA, permitindo assim uma quantificação precisa do conteúdo de DNA celular nas diferentes fases do ciclo. Por meio das diferenças de ploidia do DNA é feita a segregação das células nas diferentes fases (Babes *et al.*, 2018; Riccardi; Nicoletti, 2006).

Para a fase sub-G0, as células apresentam uma hipodiploidia ($<2n$) devido à fragmentação do DNA, enquanto para a fase G0/G1 elas são diploides ($2n$) e não estão em processo de duplicação. As células presentes na fase S, onde ocorre o início da replicação do material genético, tem uma diploidia maior que $2n$ e menor que $4n$. Na fase pós-replicativa, denominada de G2/M, na qual o DNA encontra-se totalmente duplicado, as células apresentam uma ploidia de $4n$ (Babes *et al.*, 2018; Khurana *et al.*, 2019).

Na figura 12, estão representados alguns dos histogramas obtidos durante as análises.

Figura 12 – Efeito da fase vapor do OE de *Pogostemon cablin* sobre o ciclo celular das células A549



Como controle negativo empregou-se salina 0,9% (A) e veículo (B). As células foram tratadas pelo período de 24h com o vapor do OE de patchouli em diferentes concentrações, variando entre 85-340 µg/mL, onde em (C) e (D) estão representados os histogramas das concentrações de 170 µg/mL e 340 µg/mL, respectivamente. As fases do ciclo celular estão representadas por P2 (Sub-G0); P3 (G0/G1); P4 (S) e P5 (G2/M).

O tratamento por 24h com o vapor do OE de patchouli induziu um aumento significativo no percentual de células em G0/G1, a partir da menor concentração de 85 µg/mL ($73,54 \pm 0,50$ %) até a maior concentração de 340 µg/mL ($81,16 \pm 0,47$ %), em comparação com o controle ($68,63 \pm 2,16$ %), conforme demonstrado na Tabela 4.

O veículo apresentou um aumento significativo no percentual de células em G0/G1 ($72,23 \pm 0,15$ %), dado respaldado pelo estudo de Komura *et al.* (2022),

onde o propilenoglicol gerou parada em G1 em células normais da via respiratória.

Para a fase Sub-G0, não houve alteração significativa nos grupos tratados com a fase vapor do OE de patchouli em comparação ao controle ($2,30 \pm 0,32 \%$), o que indica que não houve fragmentação do DNA, um marcador do processo de indução da apoptose (Majtnerová; Roušar, 2018) (Tabela 4).

Também foi possível observar que houve um decréscimo significativo no percentual de células da fase S a partir da concentração de $85 \mu\text{g/mL}$ até $340 \mu\text{g/mL}$ ($9,99 \pm 0,54$ e $5,22 \pm 0,33 \%$, respectivamente), em comparação ao controle ($12,74 \pm 0,74 \%$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição percentual das células A549 nas fases do ciclo celular após tratamento das células com a fase vapor do OE de *P.cablin*

Distribuição das células na fase do ciclo celular				
Tratamento	Sub-G0	G0/G1	S	G2/M
Controle	$2,30 \pm 0,32$	$68,63 \pm 2,16_{\#}$	$12,74 \pm 0,74_{\#}$	$16,20 \pm 1,21$
Veículo ($0 \mu\text{g/mL}$)	$2,36 \pm 0,41$	$72,23 \pm 0,15^*$	$11,34 \pm 0,04^*$	$14,34 \pm 0,96$
$85 \mu\text{g/mL}$	$2,51 \pm 0,58$	$73,54 \pm 0,50^*_{\#}$	$9,99 \pm 0,54^*_{\#}$	$13,64 \pm 0,75^*_{\#}$
$127,5 \mu\text{g/mL}$	$1,89 \pm 0,16$	$78,21 \pm 0,91^*_{\#}$	$7,62 \pm 0,29^*_{\#}$	$12,08 \pm 0,63^*_{\#}$
$170 \mu\text{g/mL}$	$2,24 \pm 0,34$	$79,40 \pm 1,11^*_{\#}$	$7,15 \pm 0,75^*_{\#}$	$11,31 \pm 0,47^*_{\#}$
$340 \mu\text{g/mL}$	$1,85 \pm 0,16$	$81,16 \pm 0,47^*_{\#}$	$5,22 \pm 0,33^*_{\#}$	$12,31 \pm 0,98^*_{\#}$

As células A549 foram tratadas com o vapor do OE de patchouli por 24 horas, com concentrações variando de $0-340 \mu\text{g/mL}^{-1}$, onde $0 \mu\text{g/mL}$ representa o veículo (propilenoglicol e etanol 25:75 + salina 0,9%). Os resultados obtidos são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=3-8$). Os símbolos * representam diferença estatística evidenciada pela ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$) em relação ao controle (salina) e # representam diferença estatística em relação ao veículo.

No que tange à fase G2/M, houve uma diminuição significativa da porcentagem das células a partir da concentração de $85 \mu\text{g/mL}$ ($13,64 \pm 0,75 \%$) até a maior concentração de $340 \mu\text{g/mL}$ ($12,31 \pm 0,98 \%$), em comparação com o controle ($16,20 \pm 1,21 \%$) (Tabela 4).

O aumento do pico da fase G0/G1 e diminuição do pico das fases S e G2/M, obtidos pelo ensaio de citometria, indicam que a fase vapor do OE de patchouli gerou parada do ciclo em G0/G1. Esses dados são consistentes com os de Liang *et al.* (2023), os quais evidenciaram que o patchoulol, composto

majoritário do OE de patchouli, empregado em fase líquida promove um aumento do percentual de células na fase G0/G1, acompanhado de uma diminuição no número de células na fase S e G2/M em células de câncer de pulmão (linhagem A549).

Dados da literatura também demonstraram que o patchoulol diminuiu a expressão das proteínas regulatórias do ciclo celular: ciclina D1 e PCNA, e aumentou a expressão da proteína p21 em células de câncer gástrico (linhagens NCI-N87 e HGC-27), gerando parada do ciclo na fase G0/G1. Além disso, já foi constatado que o composto também gerou parada em G0/G1 em células de melanoma (linhagem B16F10), por meio da diminuição da ciclina D1 e da CDK4, proteína regulatória de progressão do ciclo (Chang *et al.*, 2023; Song *et al.*, 2021).

Quanto ao efeito da fase vapor dos OEs e seus respectivos mecanismos de ação, o estudo conduzido por Seal *et al.* (2012) demonstrou que o vapor do OE de *Litsea cubeba* causou parada do ciclo na fase G1 para a fase S, devido ao aumento da porcentagem das células em G0/G1 e diminuição nas fases S e G2/M em células tumorais de pulmão (linhagem A549), efeito também observado neste estudo. Os autores evidenciaram que a inibição da fosforilação da proteína Akt causa a superexpressão da proteína p53 e, conseqüentemente, aumento da expressão de p21, a qual se liga à ciclina D1, impedindo a progressão das células da fase G1 para a fase S.

6 CONCLUSÕES

A fase vapor do OE de patchouli apresentou efeito citostático para as linhagens de carcinoma de pulmão A549 e H292.

A linhagem H292 foi a menos responsiva à fase vapor do OE de patchouli, com um maior valor de ICV50 (concentração do OE capaz de gerar vapor suficiente para reduzir a viabilidade celular em 50%) quando comparada à linhagem A549.

A fase vapor do OE também reduziu a viabilidade celular das células não tumorais (MRC-5). Todavia, de acordo com o número de passagens da linhagem, foram observados dois perfis de resposta, um mais refratário e outro mais sensível ao tratamento, e que, por conseguinte, resultaram em dois valores de IS diferentes, ambos com valor inferior a dois, demonstrando uma ausência de seletividade do vapor do OE às linhagens tumorais.

Na linhagem A549, a fase vapor promoveu a redução da viabilidade celular de maneira tempo-dependente, da densidade celular e da capacidade de migração. Além disso, também gerou parada do ciclo na fase G0/G1, o que demonstra, em conjunto com os resultados apontados, que este OE apresenta efeitos antiproliferativos. Contudo, é necessário investigar mais detalhadamente os mecanismos associados a este efeito do OE.

REFERÊNCIAS

- ACS. **Key statistics for lung cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/about/key-statistics.html>. Acesso em: 14 jun. 2023.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, p. 1213-1221, n. 14, 2016. Disponível em: <https://openaccess.iyte.edu.tr/bitstream/11147/6976/1/6976.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2024.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 407-426, n. 6, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ffj.2024>. Acesso em: 19 jul.2023.
- ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 29, p. 118-129, n. 1, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/9wKB9z7fFmnVTZtGYbzhj5F/>. Acesso em: 17 maio. 2023.
- ANAND, U. *et al.* Cancer chemotherapy and beyond: current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes & Diseases**, v. 10, p. 1367-1401, n. 4, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304222000472>. Acesso em: 27 jun. 2023.
- ARAFAT, K. *et al.* *Origanum majorana* essential oil decreases lung tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 155, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222011519#bib1>. Acesso em: 10 out. 2023.
- AYESH, B. M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. *In vitro* inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 612, p. 1–6, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25194985/>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- BABES, R. M. *et al.* Simple discrimination of sub-cycling cells by propidium iodide flow cytometric assay in Jurkat cell samples with extensive DNA fragmentation. **Cell Cycle**, v. 17, p. 766–779, n. 6, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5969556/>. Acesso em: 06 jun. 2024.
- BADE, B. C.; DELA CRUZ, C.S. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. **Clinics in Chest Medicine**, v. 41, p. 1-24, n. 1, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32008623/>. Acesso em: 14 jun. 2023.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils--a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 446-475, n. 2, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17996351/>. Acesso em: 12 jul. 2023.

BALDI, A. *et al.* Tumor suppressors and cell-cycle proteins in lung cancer. **Pathology Research International**, p. 1-12, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189597/>. Acesso em: 28 maio. 2023.

BASKAR, R. *et al.* Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, p. 193-199, n. 3, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22408567/>. Acesso em: 26 jun. 2023.

BAYALA, B. *et al.* Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. **American Journal of Cancer Research**, v. 4, n. 6, p.591–607, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4266698/>. Acesso em: 19 jul. 2023.

BEEK, T. A. V.; JOULAIN, D. The essential oil of patchouli, *Pogostemon cablin*: A review. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 33, p. 6-51, n. 1, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.3418>. Acesso em: 26 jul. 2023.

BLOWMAN, K. *et al.* Anticancer properties of essential oils and other natural products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-12, 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/3149362/>. Acesso em: 05 jul. 2023.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, n. 3, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15246235/>. Acesso em: 16 jul. 2023.

CAI, J. *et al.* Patchouli alcohol suppresses castration-resistant prostate cancer progression by inhibiting NF-κB signal pathways. **Translational Andrology and Urology**, v. 11, p. 528-542, n. 4, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9085927/>. Acesso em: 30 jan. 2024.

CAO, B.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. The burden and prevention of premature deaths from noncommunicable diseases, including cancer: a global perspective. In: WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. **World cancer report: cancer research for cancer prevention**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2020.

CHANG, K-F. *et al.* The effects of patchouli alcohol and combination with cisplatin on proliferation, apoptosis and migration in B16F10 melanoma cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 27, p. 1423-1435, n. 10, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10183711/>. Acesso em: 30 jan. 2024.

CHEN, X. *et al.* Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. **Cell Death & Disease**, v. 974, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-022-05408-1>. Acesso em: 07 jun. 2023.

CHIEN, J-H. *et al.* Extract of *Pogostemon cablin* possesses potent anticancer activity against colorectal cancer cells in vitro and in vivo. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7499317/>. Acesso em: 30 jul. 2023.

CORMIER, N. *et al.* Optimization of the wound scratch assay to detect changes in murine mesenchymal stromal cell migration after damage by soluble cigarette smoke extract. **Journal of Visualized Experiments**, v. 106, p. 1-9, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692776/>. Acesso em: 08 jun. 2024.

CRISMAN, H. A.; STEINKAMP, J. A. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. **The Journal of Cell Biology**, v. 59, p. 766-771, n. 3, 1973. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4128323/>. Acesso em: 14 jun. 2024.

CRUZ, C. S. D.; TANOUE, L. T.; MATTHAY, R. A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, p. 605-644, n. 4, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22054876/>. Acesso em: 18 jun. 2023.

DRAGAR, Č.; KRALJ, S.; KOCBEK, P. Bioevaluation methods for iron-oxide-based magnetic nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, p. 1-20, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517321001526>. Acesso em: 21 jun. 2024.

DAS, S. *et al.* Causes of cancer: physical, chemical, biological carcinogens, and viruses. In: KUNDU, S. C.; REIS, R. L. **Biomaterials for 3D tumor modeling**. Amsterdam, NL; Oxford, UK; Massachusetts, USA, 2020.

DE GODOY, M. C.; MACEDO, J. A.; GAMBERO, A. Researching new drug combinations with senolytic activity using senescent human lung fibroblasts MRC-5 cell line. **Pharmaceutics**, v. 17, p. 1-14, n. 1, 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10818379/#app1-pharmaceutics-17-00070>. Acesso em: 02 fev. 2024.

DEGUERRY, F. *et al.* The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 454, p. 123-136, n. 2, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16970904/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

DE LIMA; K. Y. N.; CANCELA, M. C.; DE SOUZA, D. L. B. Spatial assessment of advanced-stage diagnosis and lung cancer mortality in Brazil. **PLoS ONE**, v. 17, n. 3, 2022. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0265321>. Acesso em: 13 jun. 2023.

DENISENKO, T. V.; BUDKEVICH, I. N.; ZHIVOTOVSKY, B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma. **Cell Death & Disease**, v. 9, p. 1-14, n. 2, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41419-017-0063-y>. Acesso em: 12 jan. 2024.

DE SOUSA, D. P. *et al.* Essential oils: chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, v. 13, p. 1-29, n. 7, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/13/7/1144>. Acesso em: 16 jan. 2024.

DHIFI, W. *et al.* Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28930135/>. Acesso em: 13 out. 2023.

DONELIAN, A. *et al.* Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 15-20, n. 1, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896844608003008>. Acesso em: 26 jul. 2023.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, n. 4, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17199238/>. Acesso em: 18 out. 2023.

EL-SAWI, S. A.; MOTAWAE, H. M.; ALI, A. M. Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in egypt. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, p. 417-426, n. 4, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2816504/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

EYMIN, B.; GAZERRI, S. Role of cell cycle regulators in lung carcinogenesis. **Cell Adhesion & Migration**, v. 4, p. 114-123, n. 1, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2852568/>. Acesso em: 28 maio. 2023.

FELIP, E. *et al.* Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell Lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p.3138-3145, n. 19, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20516435/>. Acesso em: 25 jun. 2023.

GALETTI, M. *et al.* Effect of ABCG2/BCRP expression on efflux and uptake of Gefitinib in NSCLC cell lines. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–18, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0141795#:~:text=Here%20we%20show%20that%20the,of%20gefitinib%20into%20the%20cells>. Acesso em: 10 jan. 2024.

GALOVIČOVÁ, L. *et al.* Biological activity of *Pogostemon cablin* essential oil and its potential use for food preservation. **Agronomy**, v. 12, n. 2, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/12/2/387>. Acesso em: 27 set. 2024.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-23, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25003106/>. Acesso em: 22 jul. 2023.

GLOBOCAN. World fact sheets. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>. Acesso em: 19 maio. 2023.

GRIDELLI, C. *et al.* Non-small-cell lung cancer. **Nature Reviews Disease**, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27188576/>. Acesso em: 16 jun. 2023.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Apoptosis: programmed cell death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, n. 3, 2007. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1801/1083>. Acesso em: 20 maio. 2024.

GUIMARÃES, E. G. **Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica da associação entre um composto de coordenação de cobre e o fármaco cisplatina**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2019. Disponível em: <https://uenf.br/posgraduacao/biociencias-biotecnologia/wp-content/uploads/sites/12/2020/08/disserta%C3%A7%C3%A3o-final-com-ficha-catalografica-certa.pdf>. Acesso em: 20 maio. 2023.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-740, n. 5, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/>. Acesso em: 06 jun. 2023.

HASHEM, S. *et al.* Targeting cancer signaling pathways by natural products: exploring promising anti-cancer agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 150, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332222004437>. Acesso em: 12 out. 2023

HILLMAN, G.G. *et al.* Soy isoflavones radiosensitize lung cancer while mitigating normal tissue injury. **Radiotherapy and Oncology**, v. 101, p. 329–336, n. 2, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167814011006360#:~:text=Conclusions,injury%20to%20normal%20lung%20tissue>. Acesso em: 19 maio. 2024.

HOUSMAN, G. *et al.* Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers**, v. 6, p. 1769-1792, n. 3, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4190567/>. Acesso em: 05 jul. 2023.

HULKOWER K. I.; HERBER R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. **Pharmaceutics**, v. 3, p. 107-24, n. 1, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24310428/>. Acesso em: 23 fev. 2024.

INAMURA, K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. **Frontiers in Oncology**, v. 7, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28894699/>. Acesso em: 18 jun. 2023.

INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**, 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2020a.

INCA. Brasil terá 625 mil novos casos de câncer a cada ano do triênio 2020-2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/noticias/brasil-tera-625-mil-novos-casos-de-cancer-cada-ano-do-trienio-2020-2022>. Acesso em: 20 maio. 2023b.

INCA. Câncer de pulmão. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pulmao#:~:text=O%20tabagismo%20e%20a%20exposi%C3%A7%C3%A3o,consumo%20de%20derivados%20de%20tabaco>. Acesso em: 11 jun. 2023c.

INCA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022a.

INCA. Estatísticas de câncer. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>. Acesso em: 13 jun. 2023b.

INCA. INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/ptbr/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em: 20 maio. 2023.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO n.3.757**: Oil of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.], 2 ed. Genebra: ISO, 2002. Disponível em: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/32035/01ce2b0f2fb947a5b31c02c63b4f3da3/ISO-3757-2002.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2024.

JIANG, R-D.; SHEN, H.; PIAO, Y-J. The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 51, p. 663-667, n. 4, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21103623/>. Acesso em: 14 jun. 2024.

JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 295-312, n. 1, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10331086/>. Acesso em: 29 maio. 2023.

JOYCE, C.; RAYI, A.; KASI, A. Tumor supressor genes. *In*: **StatPearls [internet]**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023.

JUNREN, C. *et al.* Pharmacological activities and mechanisms of action of *Pogostemon cablin* Benth: a review. **Chinese Medicine**, v. 16, n. 1, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7791836/>. Acesso em: 29 jul. 2023.

KANWAL, R.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Cancer epigenetics: an introduction. **Methods in Molecular Biology**, v. 1238, p. 3-25, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25421652/>. Acesso em: 05 jun. 2023.

KHURANA, L. *et al.* Elucidating the role of an immunomodulatory protein in cancer: from protein expression to functional characterization. *In*: **Methods in Enzymology: Tumor Immunology and Immunotherapy – Molecular Methods**. S.I: Academic Press, 2019. Cap. 17, p. 307-360.

KOK, T. *et al.* Mini-review: extraction of patchouli oil from *Pogostemon cablin* Benth. leaves. **E3S Web of Conference**, v. 374, 2023. Disponível em: https://www.e3sconferences.org/articles/e3sconf/abs/2023/11/e3sconf_3rdnrls2023_00036/e3sconf_3rdnrls2023_00036.html. Acesso em: 29 jul. 2023.

KOMURA, M. *et al.* Propylene glycol, a component of electronic cigarette liquid, damages epithelial cells in human small airways. **Respiratory Research**, v. 23, p. 1-12, n. 1, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35999544/>. Acesso em: 09 jan. 2024.

KRAMER, N. *et al.* *In vitro* cell migration and invasion assays. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 752, p. 10-24, n. 1, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383574212000464>. Acesso em: 08 jun. 2024.

KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **The Journal of Cell Biology**, v. 66, p. 188-193, n. 1, 1975. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/49354/>. Acesso em: 14 jun. 2024.

LABABEDE, O.; MEZIANE, M. A. The eighth edition of TNM staging of lung cancer: reference chart and diagrams. **The Oncologist**, v. 23, p. 844-848, n. 7, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29650687/>. Acesso em: 23 jun. 2023.

LAGE, H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 3145-3167, n. 20, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18581055/>. Acesso em: 10 maio. 2024.

LARSEN, J. E.; MINNA, J. D. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, p. 703-740, n. 4, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367865/>. Acesso em: 16 jun. 2023.

LELE, J. Tumorigenesis: a multifaceted process and genetic changes. **Journal of Probiotics & Health**, v. 11, p. 1-2, n. 3, 2023. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access-pdfs/tumorigenesis-a-multifaceted-process-and-genetic-changes.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2024.

LEMJABBAR-ALAOUI, H. *et al.* Lung cancer: biology and treatment options. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer**, v. 1856, p. 189-210, n. 2, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4663145/#:~:text=Treatment%20options%20for%20lung%20cancer,type%20and%20stage%20of%20cancer>. Acesso em: 23 jun. 2023.

LI, A. *et al.* Hypermethylation of ATP-binding cassette B1 (ABCB1) multidrug resistance 1 (MDR1) is associated with cisplatin resistance in the A549 lung adenocarcinoma cell line. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 6, p. 412–421, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iep.12212>. Acesso em: 12 jan. 2024.

LI, D. *et al.* The effects of aromatherapy on anxiety and Depression in people with cancer: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 1-13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/public-health/articles/10.3389/fpubh.2022.853056/full>. Acesso em: 12 jul. 2024.

LIANG, C-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, p. 329-333, n. 2, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406593/>. Acesso em: 18 out. 2023.

LIANG, C-Y. *et al.* Patchouli alcohol induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in vincristine-resistant non-small cell lung cancer through ROS-mediated DNA damage. **Thoracic Cancer**, v. 14, p. 2007-2017, n. 21, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1759-7714.14982>. Acesso em: 31 jul. 2023.

LU, X.G. *et al.* Molecular role of EGFR-MAPK pathway in patchouli alcohol-induced apoptosis and cell cycle arrest on A549 cells *in vitro* and *in vivo*. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-12, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27830146/>. Acesso em: 31 jul. 2023.

MAEDA, L. E. **Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth em células de adenocarcinoma de pulmão - calu-3**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

MAJTNEROVÁ, P.; ROUŠAR, T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**. v.45, p.1469-1478, n. 5, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-018-4258-9>. Acesso em: 20 set. 2024.

MALHOTRA, J. *et al.* Risk factors for lung cancer worldwide. **The European Respiratory Journal**, v. 48, p. 889-902, n. 3, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27174888/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

MAO, Y. *et al.* Epidemiology of lung cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 25, p. 439-445, n. 3, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27261907/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

MARTELLI, A. M. *et al.* Nuclear apoptotic changes: an overview. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, p. 634-646, n. 4, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11500941/>. Acesso em: 20 maio. 2024.

MATHIAS, C. *et al.* Lung Cancer in Brazil. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 15, p. 170-175, n. 2, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32127184/>. Acesso em: 10 out. 2023.

MEHDIZADEH, L.; MOGHADDAM, M. Essential oils: biological activity and therapeutic potential. *In*: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. **Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods**. Cambridge, Massachusetts: Academic Press, 2018. Cap. 10, p. 167-179.

MENEZES, M. S. **O papel do jaspamídeo na dinâmica do citoesqueleto de actina das células de melanoma: relação com migração e invasão**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MOLINA, J. R. *et al.* Non–small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, p. 584-594, n. 5, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2718421/>. Acesso em: 25 jun. 2023.

MOON, Y. *et al.* Differing histopathology and prognosis in pulmonary adenocarcinoma at central and peripheral locations. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8, p. 169-177, n. 1, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4740167/>. Acesso em: 19 jun. 2023.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, n. 1-2, 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6606682/>. Acesso em: 17 out. 2023.

MOURITZEN, M. V.; JENSSEN, H. Optimized scratch assay for in vitro testing of cell migration with an automated optical camera. **Journal of Visualized Experiments**, v. 138, p. 1-6, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6126681/>. Acesso em: 08 jun. 2024.

MUGAO, L. G. *et al.* Characterization of the volatile components of essential oils of selected plants in Kenya. **Biochemistry Research International**, v. 2020, 2020. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bri/2020/8861798/>. Acesso em: 12 jul. 2023.

MUHAMMAD, S. *et al.* Characterization of bioactive compounds from patchouli extracted via supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction. **Molecules**, v. 27, n. 18, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36144760/>. Acesso em: 28 jul. 2023.

NADAL, M. D. C.; KANUNFRE, C.C. Avaliação da citotoxicidade da fase vapor do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth em células A549. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XXVIII, 2019, Ponta Grossa. **Avaliação da citotoxicidade da fase vapor do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth em células A549** [...] Ponta Grossa: UEPG, 2019.

NCI. Non-small cell lung cancer treatment (PDQ®)- health professional version. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq>. Acesso em: 20 jun. 2023a.

NCI. Advances in lung cancer research. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/lung/research>. Acesso em: 25 jun. 2023b.

NEWKIRK, K. M.; BRANNICK, E. M.; KUSEWITT, D. F. Neoplasia and tumor biology. In: ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 6. ed. Missouri: Mosby, 2017.

OLIVEIRA, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 79, p. 593-616, n. 4, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/KLmQ4TC7LLXg8tL9YrrmkxP/?lang=en>. Acesso em: 06 jun. 2023.

OMS. Câncer. Disponível em: https://www.who.int/healthtopics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 17 maio. 2023.

PANDEY, S. K. *et al.* Essential oil compositions, pharmacological importance and agro technological practices of Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): a review. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 24, p. 1212-1226, n. 6, 2022. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/0972060X.2021.1995511>. Acesso em: 29 jul. 2023.

PAPAZISIS, K.T. *et al.* Optimization of the suforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 208, p. 151-158, n. 2, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9433470/>. Acesso em: 17 out. 2023.

PARK, M-T.; LEE, S-J. Cell cycle and cancer. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 60-65, n. 1, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12542976/>. Acesso em: 23 maio. 2023.

POLANCO, D. *et al.* Prognostic value of symptoms at lung cancer diagnosis: a three-year observational study. **Journal of Thoracic Disease**, v. 13, p. 1485-1494, n. 3, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8024804/>. Acesso em: 13 jun. 2023.

PRITCHARD, R. S.; ANTONHY, S. P. Chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone in the treatment of locally advanced, unresectable, non-small-cell lung cancer . **Annals of Internal Medicine**, v. 125, p. 723-729, n. 9, 1996. Disponível em: <https://www.acpjournals.org/doi/epdf/10.7326/0003-4819-125-9-199611010-00003>. Acesso em: 25 jun. 2023.

RAMOS, A.; SADEGHI, S.; TABATABAEIAN, H. Battling chemoresistance in câncer: root causes and strategies to uproot them. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34502361/>. Acesso em: 11 out. 2023.

RAUT, J. S; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669014005196>. Acesso em: 12 fev. 2024.

RAVIZZA, R. *et al.* Role of the p53/p21 system in the response of human colon carcinoma cells to Doxorubicin. **BMC Cancer**, v. 4, p. 1-10, n. 1, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC544559/>. Acesso em 06 fev. 2024.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1458–1461, n. 3, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406435/>. Acesso em: 06 jun. 2024.

RISS, T. L. *et al.* Cell viability assays. In: MARKOSSIAN, S. *et al.* **The Assay Guidance Manual**. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Acesso em: 21 jun. 2024.

RODEN, A. C. *et al.* Histopathologic, immunophenotypic and cytogenetic features of pulmonary mucoepidermoid carcinoma. **Modern Pathology**, v. 27, p. 1479–1488, n. 11, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/modpathol201472#citeas>. Acesso em: 10 jan. 2024.

RUSSO, R. *et al.* Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/397821/>. Acesso em: 16 jul. 2023.

SAKAMOTO, A. *et al.* Drug transporter protein quantification of immortalized human lung cell lines derived from tracheobronchial epithelial cells (Calu-3 and BEAS2-B), bronchiolar–alveolar cells (NCI-H292 and NCI-H441), and alveolar type II-like cells (A549) by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 3029-3038, n. 9, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jps.24381>. Acesso em: 10 jan. 2024.

SAMARTH, R.; SAMARTH, M.; MATSUMOTO, Y. Medicinally important aromatic plants with radioprotective activity. **Future Science OA**, v. 3, n. 4, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29134131/>. Acesso em: 12 jul. 2023.

SANTOS, M. O. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700#:~:text=Resultados%3A%20S%3%A3o%20esperados%20704%20mil,ocorrer%C3%A3o%20483%20mil%20casos%20novos>. Acesso em: 20 maio. 2023.

SARKIC, A.; STAPPEN, I. Essential oils and their single compounds in cosmetics—a critical review. **Cosmetics**, v. 5, n. 1, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-9284/5/1/11>. Acesso em: 16 jul. 2023.

SAZONOVA, E. *et al.* Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death. **Cell Death Discovery**, v. 8, p. 1-11, n. 1, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9568594/>. Acesso em: 21 jun. 2024.

SCHÄUBLE, S. *et al.* Quantitative model of cell cycle arrest and cellular senescence in primary human fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042150>. Acesso em: 02 fev. 2024.

SEAL, S. *et al.* Vapor of volatile oils from *Litsea cubeba* seed induces apoptosis and causes cell cycle arrest in lung cancer cells. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-11, n. 10, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3473030/#:~:text=Here%20we%20report%20that%20vapor,cancer%20cell%20survival%20and%20proliferation>. Acesso em: 17 out. 2023.

SHAFIQUE, M.; TANVETYANON, T. Immunotherapy alone or chemo-immunotherapy as front-line treatment for advanced non-small cell lung cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 19, p. 225-232, n. 3, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30657338/>. Acesso em: 26 jun. 2023.

SHANKER, M. *et al.* Drug resistance in lung cancer. **Lung cancer: Targets and Therapy**, v. 1, p. 23-36, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5312467/#:~:text=Non%2Dsmall%20cell%20lung%20cancer,continued%20administration%20of%20the%20drug>. Acesso em: 10 maio. 2024.

SHI, J. *et al.* Epidemiology and prognosis in young lung cancer patients aged under 45 years old in northern China. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7994834/#CR11>. Acesso em: 14 jun. 2023.

SHIELDS, M. D.; MARIN-ACEVEDO, J. A.; PELLINI, B. Immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a decade of progress. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 41, p. 1-23, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33979196/>. Acesso em: 26 jun. 2023.

SHIN, Y. K. *et al.* Effects of short-term inhalation of patchouli oil on professional quality of life and stress levels in emergency nurses: a randomized controlled trial. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 26, p. 1032-1038, n. 11, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32907352/>. Acesso em: 12 jul. 2024.

SOCIEDADE AMERICANA DE CÂNCER (ACS). Lung Cancer Risk Factors. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>. Acesso em: 14 jun. 2023.

SONG, Y. *et al.* Regulatory mechanism and experimental verification of patchouli alcohol on gastric cancer cell based on network pharmacology. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 1-15, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8440821/>. Acesso em: 30 jan. 2024.

SUN, J. *et al.* Chemical composition and biological activities of essential oils from six lamiaceae folk medicinal plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1-18, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35979072/>. Acesso em: 19 set. 2024.

SUNDARESAN, V. *et al.* Composition and Comparison of Essential Oils of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Patchouli) and *Pogostemon travancoricus* Bedd. var. *travancoricus*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, p. 220-222, n. 3, 2009. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2009.9700152>. Acesso em: 27 set. 2024.

SUNG, H. *et al.* Global câncer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, p. 209-249, n. 3, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/#:~:text=The%20global%20cancer%20burden%20is,associated%20with%20globalization%20and%20a>. Acesso em: 17 maio. 2023.

SWAMY, M. K.; SINNIHA, U. R. A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth.: an aromatic medicinal plant of industrial importance. **Molecules**, v. 20, p. 8521-8547, n. 5, 2015b. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6272783/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

SWAMY, M. K.; SINNIHA, U. R. Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): botany, agrotechnology and biotechnological aspects. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 161-176, 2016a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016302485>. Acesso em: 26 jul. 2023.

TANG, W-F. *et al.* Adjuvant immunotherapy in early-stage resectable non-small cell lung cancer: A new milestone. **Frontiers in Oncology**, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9909200/>. Acesso em: 25 jun. 2023.

THAI, A. *et al.* Lung cancer. **The Lancet**, v. 398, p. 535-554, n. 10299, 2021. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)00312-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)00312-3/fulltext). Acesso em: 10 jun. 2023.

THUN, M. J. *et al.* Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 9, 2008.

Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050185>.

Acesso em: 14 jun. 2023.

TILSED, C. M. *et al.* Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. **Frontiers Oncology**, v. 12, 2022.

Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.960317/full>.

Acesso em: 05 jul. 2023.

TRANG, D. T. *et al.* Essential oils of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 lung cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1-8, 2020. Disponível em:

<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/5924856/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

TSAI, C-C. *et al.* Induction of apoptosis in endometrial cancer (Ishikawa) cells by *Pogostemon cablin* aqueous extract (PCAE). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, 2015. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26042464/>. Acesso em: 30 jul. 2023.

VERMA, R. M. *et al.* Chemical composition of leaves, inflorescence, whole aerial-parts and root essential oils of patchouli {*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.}.

Journal of Essential Oil Research, v. 31, p. 1-7, n. 4, 2019. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2019.1566100>. Acesso

em: 27 set. 2024.

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

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17406391/>. Acesso em: 17 out. 2023.

VINOD, S. K.; HAU, E. Radiotherapy treatment for lung cancer: current status and future directions. **Respiratology**, 2020. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32516852/>. Acesso em: 26 jun. 2023.

WANG, Y. *et al.* Effect of staurosporine on the mobility and invasiveness of lung adenocarcinoma A549 cells: an *in vitro* study. **BMC Cancer**, v. 9, p. 1-12, n. 1, 2009. Disponível em:

<https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-9-174#:~:text=Conclusion,and%20invasion%20of%20A549%20cells>. Acesso

em: 19 maio. 2024.

WANG, X. *et al.* GC-MS and UHPLC-QTOFMS-assisted identification of the differential metabolites and metabolic pathways in key tissues of *Pogostemon cablin*. **Frontiers in Plant Science**, v.14, p. 1-13, 2023. Disponível em:

[https://www.frontiersin.org/journals/plant-](https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1098280/full)

[science/articles/10.3389/fpls.2023.1098280/full](https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1098280/full). Acesso em: 23 fev. 2024.

WARREN, G. W.; CUMMINGS, K. M. Tobacco and lung cancer: risks, trends, and outcomes in patients with cancer. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 33, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23714547/>. Acesso em: 14 jun. 2023.

WESTON, A.; HARRIS, C. C. Multistage carcinogenesis. In: KUFEL, D. W. *et al.* **Holland-Frei cancer medicine**. 6.ed. Hamilton: BC Decker, 2003.

XI, J-J. *et al.* Primary pulmonary mucoepidermoid carcinoma: an analysis of 21 cases. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 22, p 1-7, n. 1, 2012. Disponível em: <https://wjso.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7819-10-232#citeas>. Acesso em: 10 jan. 2024.

XU, F. *et al.* Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, quality control, industrial application, pharmacokinetics and network pharmacology of *Pogostemon cablin*: a comprehensive review. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 50, p. 691-721, n. 3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35282804/>. Acesso em: 29 jul. 2023.

XU, N. *et al.* FoxM1 mediated resistance to gefitinib in non-smallcell lung cancer cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, p. 675–681, n. 5, 2012. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/aps2011188>. Acesso em: 10 jan. 2024.

YANG, L. Recent advances in biosynthesis of bioactive compounds in traditional chinese medicinal plants. **Science Bulletin**, v. 61, p. 3-17, n. 1, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095927316302225>. Acesso em: 29 jul. 2023.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, p. 807-821, n. 8, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41423-020-0488-6>. Acesso em: 26 jun. 2023.

ZHENG, M. Classification and pathology of lung cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 25, p. 447-468, n. 3, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27261908/>. Acesso em: 19 jun. 2023.

ZHENG, Y. *et al.* Lung cancer stem cell markers as therapeutic targets: an update on signaling pathways and therapies. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35719973/>. Acesso em: 12 jan. 2024.

ZU, Y. *et al.* Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 3200–3210, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20657472/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

ANEXO A – PARECER TÉCNICO DO ÓLEO ESSENCIAL



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colegiado de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

QUINARÍ UFMG

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: **QUINARÍ FRAGRÂNCIAS E COSMÉTICOS LTDA.**

CNPJ: 05.424.392/0001-30

Composição Química

ÓLEO ESSENCIAL de PATCHOULI

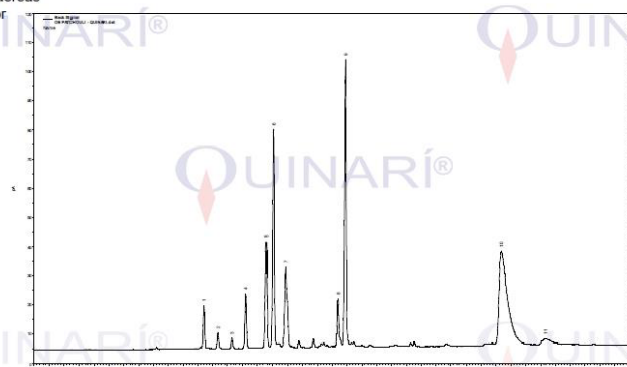
Nome comercial: Óleo essencial de Patchouli

Nomenclatura botânica: Pogostemon cablin

Parte da planta: Partes aéreas

Extração: Arraste a vapor

Origem: Indonésia



Pico	IR	Constituintes	%
calc			
1	1371	β-patchouleno	2.6
2	1384	β-elemeno	1.0
3	1396	α-gurjuneno	0.6
4	1408	β-cariofileno	3.6
5	1426	α-guaieno	6.7
6	1432	seicheleno	14.3
7	1443	α-patchouleno	8.6
8	1489	β-guaieno	4.0
9	1495	α-bulneseno	19.5
10	1632	patchoulol	31.9
11	1671	espatulenol	2.5
		outros	4.7

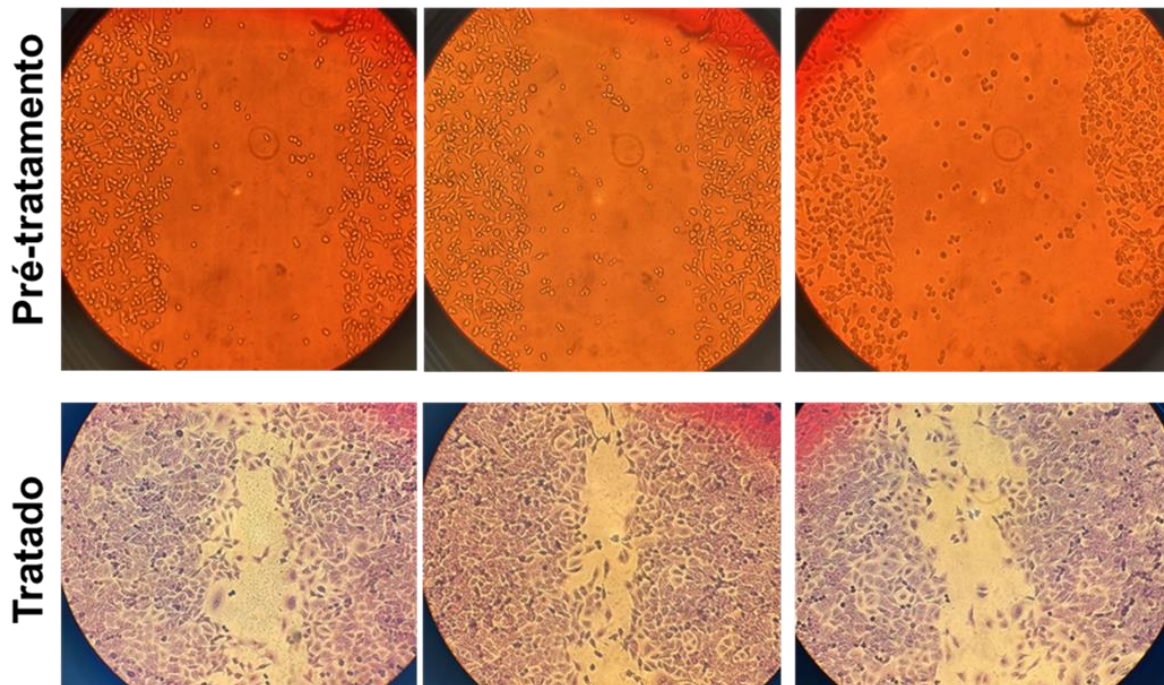
Método de análise: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás AGILENT 7620A.
Coluna: RX-1MS 30m x 0.25mm x 0.25 µm (Restek). Temp.: Coluna: 50°C (0 min), 3°C/min a 220°C.
Injetor: 220°C Split: 1/50. Detector FID: 240°C. Vol. De injeção: 1 µl.

Vany Ferraz
Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil - Cep: 31.270-901

ANEXO B – REGISTROS FOTOGRÁFICOS DO ENSAIO DE FECHAMENTO DE FENDA

A549 - Ensaio Fechamento de fenda (Controle)



A549 - Ensaio Fechamento de fenda (Tratado)

