

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

DANIELE DE FATIMA KOSMO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Jasminum officinale* EM CALU-3 (ADENOCARCINOMA DE
PULMÃO) E 3T3 (FIBROBLASTOS).**

PONTA GROSSA

2017

DANIELE DE FATIMA KOSMO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Jasminum officinale* EM CALU-3 (ADENOCARCINOMA DE
PULMÃO) E 3T3 (FIBROBLASTOS).**

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: Profª Drª Carla Cristine Kanunfre.

PONTA GROSSA

2017

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

K86 Kosmo, Daniele de Fatima
Avaliação da citotoxicidade da fase vapor do óleo essencial de Jasminum officinale Calu-3 (adenocarcinoma de pulmão) e 3T3 (fibroblastos)/ Daniele de Fatima Kosmo. Ponta Grossa, 2017.
68f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Profª Drª Carla Cristine Kanunfre.

1.Câncer de pulmão. 2.Óleo essencial.
3.Viabilidade celular. 4.Células Calu-3.
5.Células 3T3. I.Kanunfre, Carla Cristine.
II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Biomédicas.
III. T.

CDD: 576.385.5



Universidade Estadual
de Ponta Grossa

Programa de
Pós Graduação
em Ciências Biomédicas



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISILOGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 06/2017, DA MESTRANDA DANIELE DE FÁTIMA KOSMO REALIZADO NO DIA 07 DE JULHO DE 2017, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos sete dias de julho de dois mil e dezessete, às 14hs00min no auditório da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Bloco M, sala 115, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da **Professora Dra. Carla Cristine Kanunfre** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Daniele de Fátima Kosmo** na linha de pesquisa; Fisiopatologia do Metabolismo e do Sistema Imune, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professora Dra. Michele Dietrich Moura Costa (UEPG/PR)** e **Professora Dra. Juliana Bello Baron Maurer (UFPR/Pr)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **"Avaliação Da Citotoxicidade Da Fase Vapor Do Óleo Essencial De Jasmim Em Células De Adenocarcinoma De Pulmão (Calu-3)."** Encerrado a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como aprovada considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em - Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, a aluna terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): Correções conforme sugestões da banca em material entregue (dissertação impressa)

Alteração de título: sim ☒ não ☐

Novo título: Avaliação da citotoxicidade da fase vapor do óleo essencial de jasmim em linhagem de adenocarcinoma de pulmão (Calu-3)

Carla Cristine Kanunfre
Carla Cristine Kanunfre 1- (DEBIO - UEPG)- Presidente

Michele Dietrich Moura Costa
Michele Dietrich Moura Costa 2- (DEBIOGEM - UEPG) – Titular

Juliana Bello Baron Maurer
Juliana Bello Baron Maurer 3- (UFPR - Pr) – Titular

Ponta Grossa, 07 de julho de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais
Gilson e Maria de Lurdes, que
dignamente me apresentaram à
importância da família e ao caminho da
honestidade e persistência.

AGRADECIMENTOS

Quando se inicia uma nova caminhada, em novo lugar o ato de agradecer se torna constante, pois por menor que pareça a ajuda recebida, para quem a recebe tem grande dimensão.

Assim primeiramente agradeço minha família, principalmente a meus pais que sempre foram meu alicerce me incentivando a dar continuidade a meus estudos;

A Dra Carla Cristine Kanunfre por todos seus ensinamentos científicos e de vida, pelo seu incentivo, pela sua compreensão e apoio;

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas e as agências de fomento CAPES e CNPq, pela

Aos professores e colegas do programa de mestrado pelo crescimento pessoal e intelectual proporcionado por suas aulas e pelo convívio nestes dois anos;

Aos colegas de laboratório pelo trabalho de cooperação desenvolvido;

Aos meus velhos amigos que sempre acreditaram e incentivaram a minha caminhada acadêmica;

Aos novos amigos que tornaram mais leve e agradável a minha mudança de cidade.

A todas as pessoas que por menor que lhe pareça ter sido sua ajuda, uma informação, um bom dia acompanhado de um sorriso, enfim tudo que tornou mais leve e suave esta etapa da minha vida.

“Todas as coisas compartilham o mesmo sopro: o animal, a árvore, o homem. O vento que deu ao nosso bisavô o seu primeiro sopro de vida, também recebe o seu último suspiro. O ar compartilha seu espírito com toda a vida que sustenta.”

Cacique Seattle

RESUMO

KOSMO, Daniele de Fatima. Avaliação da citotoxicidade da fase vapor do óleo essencial de *jasminum officinale* em calu-3 (adenocarcinoma de pulmão) e 3t3 (fibroblastos).2017. 68. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas– Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.

O câncer de pulmão está entre os tipos mais comuns dentre todos os tumores malignos. Sendo a quimioterapia o principal tratamento preconizado, todavia além dos seus diferentes efeitos colaterais, verifica-se a resistência a múltiplos fármacos, referida como a perda da sensibilidade tumoral aos agentes quimioterápicos. Óleos essenciais (OE) podem contornar esta refratariedade dos tumores aos fármacos e se apresentam também como alternativa antitumoral, em especial pela possibilidade de serem administrados por via inalatória. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a citotoxicidade da fase vapor do OE de *Jasminum officinale* em células Calu-3 (adenocarcinoma de câncer de pulmão humano) e células 3T3 (linhagem padrão de fibroblasto murino) bem como investigar as alterações morfológicas e mecanismo de ação deste OE em Calu-3. Foram realizados ensaios de avaliação metabólica com redução de MTT e ensaio de marcação de proteína com SRB, onde verificou-se a redução da viabilidade celular de maneira dose-dependente. A IC₅₀ estimada para células Calu-3 foi de 1495,57 µg/mL e para as células 3T3 foi de 3795,05 µg/mL. Para investigação das alterações morfológicas associados à citotoxicidade, foram avaliados (1) a morfologia celular com o emprego dos corantes alaranjado de acridina, brometo de etídio; (2) distribuição de células entre as fases do ciclo celular com emprego de iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo; e foi avaliado o potencial inibitório da fase vapor do OE de *Jasminum officinale* na atividade da glicoproteína P empregando o ensaio de acúmulo de Rodamina 123. Os resultados obtidos indicaram que a morte das células foi causada pelo processo de apoptose tardia, inicial e necrose, com pequena redução da porcentagem de células nas fases sub-G0 e G2/M do ciclo celular. A fase vapor do OE de *Jasminum officinale* apresenta efeito inibitório sobre a atividade da glicoproteína P em sinergia com a curcumina. Tais resultados sugerem a possibilidade da utilização do OE de *Jasminum officinale*, em sua fase vapor no tratamento do câncer de pulmão por via inalatória, porém ainda são necessários mais estudos para aprofundar o conhecimento sobre óleos essenciais, frente a células normais e tumorais de pulmão, incluindo os mecanismos envolvidos.

PALAVRAS CHAVES: câncer de pulmão, óleo essencial, viabilidade celular, células Calu-3, células 3T3.

ABSTRACT

KOSMO, Daniele de Fatima. Evaluation of cytotoxicity of essential oil vapor phase of *jasminum officinale* in calu-3 (lung adenocarcinoma) and 3t3 cells (fibroblasts). 2017. 68. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas—Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017).

Lung cancer is among the most common types among all malignancies, with an increase of 2% per year in its incidence. Chemotherapy is the main treatment recommended, but in addition cause collateral effects and also resistance to multiple drugs can occur, that is, the loss of tumor sensitivity to chemotherapeutic agents. Essential oils (OE) may be an option for this refractoriness of tumors to drugs and also present as an antitumor alternative, especially for the possibility of being administered by inhalation. The objective of this work was to evaluate the cytotoxicity of the vapor phase of jasmine OE in Calu-3 cells (human lung cancer adenocarcinoma) and 3T3 cells (murine fibroblast control line model). The vapor phase of jasmine OE reduces cell viability in a dose-dependent manner, as demonstrated by the MTT and SRB reduction assays. The estimated IC₅₀ for Calu-3 cells was 1495.57 µg / mL and for 3T3 cells was 3795.05 µg / mL. The possible effects associated with cytotoxicity, (1) cellular morphology, (2) cell cycle phase distribution and (3) P-glycoprotein activity were evaluated. Results indicated that cell death was caused by the late apoptosis and necrosis, reduction in the percentage of cells in the sub-G₀ and G₂/M cell cycle phases. The vapor phase of the jasmine oil presented an inhibitory effect on the activity of the glycoprotein P in synergy with curcumin. These results suggest the possibility of the use of the OE of jasmine, in its vapor phase in the treatment lung cancer, by inhalation. Further studies are needed to knowledge about essential oils, especially the so-called alternative, against normal and tumor cells of the lung, included the mechanism involved.

KEY WORDS: lung cancer, volatile oil, cell viability, Calu cells, 3T3 cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Carcinogênese.....	16
Figura 2 - Células Calu-3 e células 3T3.....	23
Figura 3 - Mecanismo de ação intracelular dos óleos essenciais.....	26
Figura 4- Foto das flores de <i>Jasminum officinale</i>	29
Figura 5- Modelo ilustrativo de semeadura das células Calu-3.	35
Figura 6- Cromatograma do óleo essencial de <i>Jasminum officinale</i> obtido por CG-MS.....	40
Figura 7 - Estrutura química do α -Hexilcinamaldeído.....	42
Figura 8- Efeito da fase vapor do óleo essencial de <i>Jasminum officinale</i> sobre células Calu-3 (72h). Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio da MTT e SRB.	45
Figura 9 - Efeito da fase vapor do óleo essencial de <i>Jasminum officinale</i> sobre células 3T3 (72h). Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio de redução do MTT e SRB.....	46
Figura 10- Efeito do óleo essencial de <i>Jasminum officinale</i> (sobre células Calu-3 em diferentes períodos de tratamento. Viabilidade celular (%) avaliada pelo ensaio do MTT e SRB	48
Figura 11 - Efeito do óleo essencial de <i>Jasminum officinale</i> sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina com brometo de etídio (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 200X e 400x) e quantificação morfológica das células.....	51
Figura 12 - Histogramas de distribuição das células Calu-3	54
Figura 13 - Acúmulo de Rodamina 123 em células Calu-3... ..	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados efetivos de óleos essenciais estudados em sua fase líquida.....27

Tabela 2 - Porcentagens dos compostos presentes no OE de *Jasminum officinale* quantificados através da cromatografia de massa gasosa.....40

Tabela 3 - Distribuição porcentual das células Calu-3 tratadas com óleo essencial de *Jasminum officinale* nas fases do ciclo celular.....53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AO	Acredine orange
BE	Brometo de Etídio
CPNPC	Carcinoma de pulmão de não-pequenas células
CPPC	Carcinoma de pulmão de pequenas células
ANOVA	Análise de variância
IARC	International Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IC₅₀	Concentração inibitória 50
CO₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
Kg	Quilograma
M	Molar
min.	Minutos
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NFκB	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
OEs	Óleos essenciais
PBS	Tampão fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
ppm	Partes por milhão
RPMI	Meio de cultura
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulfarodamina B
TCA	Ácido Tricloroacético
µg	Micrograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
ISSO	Internacional Standart Organization
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
CG	Cromatografia Gasosa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	CÂNCER DE PULMÃO- NEOPLASIAS.....	15
3.2	O CÂNCER DE PULMÃO: EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO....	17
3.3	TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO.....	19
3.4.	LINHAGENS CELULARES: CALU-3 E 3T3.....	22
3.5	OLÉOS ESSENCIAIS.....	23
3.6	<i>JASMINUM OFFICINALE</i>	28
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	FÁRMACOS, REAGENTES E SOLVENTES.....	32
4.2	ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL de <i>Jasminum officinale</i> POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	32
4.3	TRATAMENTO CELULAR.....	33
4.4	LINHAGENS CELULARES e CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	33
4.5	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO de <i>Jasminum officinale</i> EM CÉLULAS CALU-3 E 3T3.....	35
4.5.1	ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT.....	35
4.5.2	ENSAIO DA SULFARODAMINA B.....	36
4.6	CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL de <i>Jasminum officinale</i> EM CÉLULAS CALU-3.....	37
4.6.1	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MEIO DO EMPREGO DOS CORANTES ALARANJADO DE ACRIDINA COM BROMETO DE ETÍDIO (AO/BE).....	37
4.6.2	ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	38
4.6.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA P - ENSAIO DE ACÚMULO DE RODAMINA 123.....	38
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
5	RESULTADOS.....	39

5.1	ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL de <i>Jasminum officinale</i> POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	39
5.2	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E IC ₅₀ DA FASE VAPOR DO de <i>Jasminum officinale</i> EM CÉLULAS CALU-3 E 3T3.....	44
5.3	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA CELULAR DE CALU-3 TRATADAS COM A FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL de <i>Jasminum officinale</i> POR MEIO DO EMPREGO DOS CORANTES ALARANJADO DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO (AO/BE).....	50
5.4	ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE CALU-3 TRATADAS COM A FASE VAPOR DO de <i>Jasminum officinale</i> POR EMPREGO DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	53
5.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA P.....	55
6	CONCLUSÃO	59

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um evidente problema de saúde pública mundial. Tratando-se de uma doença multifatorial com o crescimento descontrolado e invasão de células anormais que conduzem à formação de tumor. O câncer de pulmão é um dos com maior incidência entre todos os tumores malignos e está associado ao consumo de tabaco e derivados.

A quimioterapia é o principal tratamento preconizado para tumores já instalado, todavia além dos diferentes efeitos colaterais, verifica-se a resistência a múltiplos fármacos. Em células humanas, o gene denominado MDR1 está envolvido com o fenômeno de resistência múltipla a drogas (MDR), cujo resultado da expressão é um tipo específico de glicoproteína, a glicoproteína-P (P-gp). Assim a busca por fármacos efetivos e atóxicos capazes de modular a resistência tem se acentuado.

Com relação aos atuais medicamentos utilizados no tratamento do câncer de pulmão, ainda não existe disponível um medicamento que tenha sido formulado para ser utilizado por via inalatória. Porém acredita-se que essa via de administração seria uma boa estratégia para o tratamento da doença, uma vez que o medicamento seria liberado diretamente no tecido alvo (tecido pulmonar).

Óleos essenciais são componentes aromáticos, denominados metabólitos secundários, obtidos a partir de diferentes partes da planta. Tais óleos contêm compostos orgânicos voláteis que apresentam uma variedade de propriedades biológicas e características ideais para serem utilizados em nebulizações e inalações, devido a sua natureza lipofílica e ao seu baixo peso molecular, pois conseguem atravessar as membranas das células com facilidade.

Dentre os óleos essenciais o de *Jasminum officinale* tem sido utilizado como analgésico, antidepressivo, anti-inflamatório, antisséptico, afrodisíaco, sedativo e expectorante, e mais recentemente como antitumoral. Os compostos voláteis do OE de *Jasminum officinale* ainda não foram investigados com relação ao seu potencial uso para câncer de pulmão.

2. OBJETIVO:

2.1. Objetivo geral:

Avaliar a citotoxicidade da fase vapor do óleo essencial de *Jasminum officinale* em células Calu-3 (adenocarcinoma de câncer de pulmão humano) e células 3T3 (linhagem padrão de fibroblasto murino), bem como investigar alterações morfológicas e o mecanismo de ação em células Calu-3.

2.2. Objetivos específicos:

- Analisar composição química do óleo essencial de *Jasminum officinale* através de cromatografia gasosa.
- Padronizar as condições de cultivo da linhagem de células Calu-3 e em células 3T3.
- Avaliar a citotoxicidade da fase de vapor do óleo essencial de *Jasminum officinale* sobre as células Calu-3 e 3T3, através de ensaios de avaliação metabólica com redução de MTT e ensaio de marcação de proteína com SRB.
- Estimar a concentração inibitória média (IC₅₀) da fase óleo essencial de *Jasminum officinale* em cultura de células Calu-3 e células 3T3 de 72 horas.
- Investigar alterações morfológicas associadas ao efeito da fase vapor óleo essencial de *Jasminum officinale* em células Calu-3, com o emprego dos corantes alaranjado de acridina, brometo de etídio;
- Investigar alterações na distribuição de células entre as fases do ciclo celular com emprego de iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo;
- Avaliar o potencial inibitório da fase vapor do óleo essencial de *Jasminum officinale* na atividade da glicoproteína P empregando o ensaio de acúmulo de Rodamina 123.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CÂNCER - NEOPLASIAS

O câncer é uma das doenças mais alarmantes nas últimas décadas em todo o mundo. Trata-se de um conjunto heterogêneo de mais de 100 tipos diferentes de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células que não respondem aos estímulos naturais de morte celular e dando origem a novas células gerando transtornos funcionais. A esse fenômeno dá-se o nome de neoplasias (tumores), que podem ser classificadas em benigna ou maligna (BRASIL, 2012; BERNARDI, 2003; BRANDÃO et al., 2010).

Neoplasias benignas são definidas por terem o crescimento celular lento e de forma organizada, apresentando limites bem definidos contrastando com as neoplasias malignas, nas quais o crescimento é mais agressivo e há potencial para invadir os tecidos vizinhos provocando metástases. As neoplasias malignas são mais resistentes aos tratamentos e geram maior risco à vida do paciente. O câncer é uma neoplasia maligna (BRASIL, 2012; GOMES, 2008).

O câncer é classificado a partir da célula normal que originou o tumor. Para fins de nomenclatura dos mais diversos tipos da doença, acrescenta-se o sufixo - oma ao termo correspondente ao tecido que lhe deu origem (p. ex.: sarcoma, carcinoma, linfoma, etc.) (ALMEIDA et al., 2005).

O câncer possui causa multifatorial podendo ser externas (fatores ambientais, hábitos e costumes da sociedade) ou internas ao organismo (determinadas geneticamente). Oncogênese ou carcinogênese, nome dado à formação do câncer, trata-se de um processo de múltiplos estágios que envolvem eventos genotóxicos, expressões genéticas alteradas no momento da transcrição, tradução e pós-tradução, bem como alterações na sobrevivência celular (proliferação e apoptose) (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000).

O processo de carcinogênese ocorre funcionalmente em três etapas: iniciação, promoção e progressão (Figura 1). A iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese, onde ocorre uma ou mais mutações no DNA promovida pelo

agente cancerígeno levando a transformação celular e tornando-a potencialmente capaz de se multiplicar de modo autônomo. O segundo estágio da carcinogênese (promoção), ocorre depois de um período prolongado de tempo de exposição. A promoção é um processo complexo, que em momentos iniciais é reversível. O terceiro e último estágio (progressão) é considerado irreversível, se caracteriza pelo aumento da instabilidade genômica e posterior progresso em direção à malignidade e ao crescimento celular autônomo. Nesse estágio o câncer encontra-se instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (MILLER,1981).

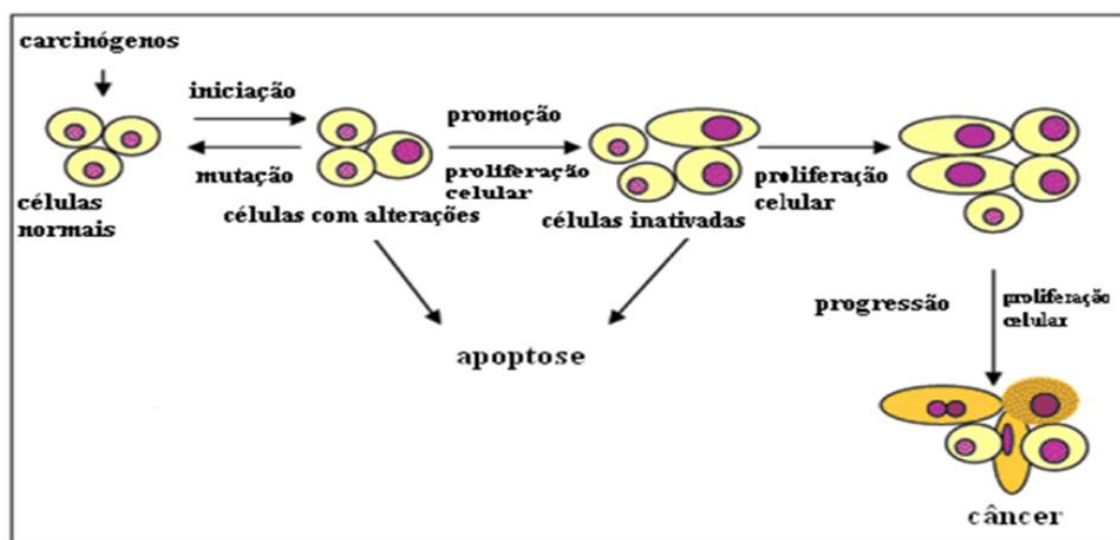


FIGURA 1. Carcinogênese. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Rio de Janeiro, 1996.

O aumento acentuado no número de casos de câncer pode ser atribuído à mudança nos hábitos alimentares, uso de tabaco e álcool, infecções crônicas, exposição à radiações nocivas e produtos químicos, ou mais amplamente devido à mudança de estilo de vida e poluição ambiental (NCI, 2013; GAUTAM *et al.*, 2014).

3.2. O CÂNCER DE PULMÃO: EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

O câncer de pulmão está entre os tipos mais comuns dentre todos os tumores malignos, com um aumento de 2% ao ano na sua incidência e que segundo os últimos informes do INCA correspondendo à 1,82 milhão de casos novos de câncer em 2014, sendo 1,24 milhão entre os homens e 583 mil entre as mulheres. No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 22.424 mortes em 2011. Este tumor é altamente letal, com sobrevida média cumulativa total em cinco anos, realidade que varia entre 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7% e 10% nos países em desenvolvimento. No fim do século XX, o câncer de pulmão se tornou uma das principais causas de morte evitáveis, devido a sua associação direta com o tabagismo (INCA, 2014).

Evidências na literatura mostram que pessoas que têm câncer de pulmão apresentam risco aumentado para o aparecimento de outros cânceres e que familiares de primeiro e segundo graus apresentam risco levemente aumentado para o desenvolvimento desse câncer (INCA, 2014).

As mutações no epitélio respiratório que originam o câncer de pulmão podem ser classificadas em duas grandes categorias: i) carcinoma de pulmão de pequenas células (CPPC) que ocorre em cerca de 15% dos pacientes; ii) e carcinoma de pulmão de não-pequenas células (CPNPC) que acomete aproximadamente 85% dos doentes de câncer de pulmão. Por sua vez, CPNPC pode ser dividido em 3 subtipos histológicos principais: i) adenocarcinoma; ii) carcinoma de células escamosas; iii) carcinoma de células grandes. Vale ressaltar que 70% dos casos de CPNPC são dos tipos histológicos adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (HANAUSKE et al., 2007).

É possível ainda possível que o câncer de pulmão apresente células características de células (CPPC) e células características de CPNPC, sendo então denominado câncer de pequenas células / não-pequenas células combinadas (combined small cell/nonsmall cell cancer) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Apesar de compartilharem de características biológicas diversas, os subtipos de câncer de pulmão diferem quanto ao tipo celular de origem, à localização no pulmão e ao padrão de crescimento, sugerindo que são

doenças distintas que se desenvolvem a partir de mecanismos moleculares diferentes (Revisado em PIKOR et al., 2013).

Embora todos os subtipos histológicos de câncer de pulmão estejam associados ao tabagismo, o carcinoma de células escamosas e o CPCP, ambos originados predominantemente nas vias respiratórias centrais, são os subtipos de câncer de pulmão mais fortemente correlacionados ao histórico de fumantes. Enquanto o carcinoma de células escamosas se origina de células basais localizadas nas vias aéreas centrais, o adenocarcinoma surge no epitélio glandular do parênquima pulmonar de pneumócitos do tipo II ou de células claras (TRAVIS et al., 2011). A incidência de tipos histológicos de câncer de pulmão declinou nos registros de casos de CPCC e carcinoma de células escamosas. Como consequência, o adenocarcinoma de pulmão é hoje a forma prevalente de câncer de pulmão (cerca de 50% de todos os casos da doença). O fenômeno tem sido atribuído às modificações na composição dos cigarros com menos alcatrão e nicotina que antes, aumentando a o número de cigarros consumidos por fumantes, os quais inalam mais fumaça. Assim, agentes carcinogênicos do tabaco se depositam predominantemente na periferia pulmonar, sítio predominante de origem de adenocarcinoma de pulmão (Revisado em PIKOR et al., 2013).

Observações clínicas de pacientes com adenocarcinoma revelaram que a doença pode metastizar rapidamente para o fígado, glândulas adrenais, ossos ou cérebro (Revisado em WALKER, 2008). Em contraste, o prognóstico de pacientes com câncer de adenocarcinoma tende a ser pior em relação a indivíduos que são diagnosticados com outros subtipos de câncer de pulmão (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). O carcinoma bronquioalveolar é uma forma de adenocarcinoma que se apresenta tipicamente com um padrão inflamatório multifocal (Revisado em WALKER, 2008), além de comumente associado a um histórico de tabagismo (NCI, 2013; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Tende a ser encontrado na região central dos pulmões, próximo aos brônquios, resultando frequentemente em obstrução endobronquial e hemoptise (Revisado em WALKER, 2008). O carcinoma de células grandes pode surgir em qualquer parte do pulmão, além de crescer e propagar-se rapidamente, dificultando o sucesso do tratamento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013). Com a identificação e classificação do tipo celular para cada

tipo de desenvolvimento do câncer de pulmão é possível, de certo modo, avaliar qual o provável desenvolvimento e resposta ao tratamento dessa malignidade para cada paciente, para a identificação e classificação dos subgrupos a análise é feita pelo tamanho, pelo formato e pela composição química quando as células são observadas ao microscópio. O motivo pelo qual as células, mesmo havendo distinção entre elas, são agrupadas em único grupo é pelo fato de serem tratadas da mesma maneira e por terem um prognóstico comumente muito similar (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), espera-se um aumento crescente no número de novos casos de câncer de pulmão nos próximos anos. Este fato pode ser percebido com o aumento de 51% no número de casos de câncer de pulmão, principalmente em mulheres. Tal aumento possui relação direta com aumento global no uso de tabaco, considerado o principal fator de risco para câncer de pulmão e causa de todos os carcinomas pulmonares. Não fumantes também são afetados por câncer de pulmão principalmente por fatores genéticos, amianto, poluição do ar, o fumo passivo e também a exposição ao radônio, que é a segunda causa principal (NAVANESAN et al., 2015).

3.3. TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO

O tratamento para o câncer pode ser realizado por três principais meios: cirurgia, radioterapia e quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005). Geralmente, o tratamento é feito por combinação dessas modalidades, mas quando possível, dá-se preferência pela cirurgia por ser a ferramenta mais eficaz (ALISON, 2011). A radioterapia é um método de tratamento local que se utiliza da radiação ionizante que leva à morte celular. A quimioterapia por sua vez, é a forma de tratamento que faz uso dos fármacos antitumorais (BRASIL, 2012).

Grande parte dos medicamentos antitumorais tem como alvo terapêutico o processo de síntese do DNA (ALISON, 2011). Pelo fato de o mecanismo de ação não ser exclusivo das células cancerígenas, essa linha de tratamento causa, também, a morte celular das células saudáveis e por isso há grande ocorrência de efeitos colaterais, como mielossupressão, náuseas, vômitos, diarreia e alopecia (RODRIGUES et al., 2012). Diante desse quadro, o grande

desafio para o tratamento da doença é a distinção entre as células normais e cancerígenas (BRANDÃO et al., 2010).

Como mencionado fármacos antitumorais apresentam relação direta com o ciclo celular. O termo ciclo celular é utilizado para descrever uma série de eventos ordenados que leva a duplicação de todos os componentes celulares e a partição fiel desses em duas partes filhas iguais (PERRY ; LEVINE, 1993). Para as células se dividirem precisam aumentar de tamanho, para que as células filhas não fiquem cada vez menores, o que normalmente ocorre na fase G1 do ciclo celular. Outro passo crucial para a divisão celular é a duplicação do material genético, nessa fase a célula tem que ter todo o seu DNA duplicado, sem exceções e sem erros (ZHOU; ELLEDGE, 2000). Precisa também ter controle para que esse material só seja duplicado e não triplicado, ou quadruplicado, evento que ocorre na fase S. Na fase G2 a célula se prepara para a divisão e para com o intuito de checar se está pronta para se dividir. A divisão propriamente dita ocorre na fase M, que também é chamada de mitose. Nessa fase, as sequências duplicadas serão separadas e enviadas para cada uma das células filhas e a célula vai se dividir, seguindo, cada um dos produtos, o ciclo celular novamente.

Os fármacos antitumorais podem ser classificados de forma arbitrária em dois grandes grupos: os agentes ciclo celular específicos que agem em uma das fases do ciclo celular, bloqueando etapas importantes no processo de duplicação da célula e, agentes ciclo celular não específicos, cujo mecanismo de ação não depende da fase do ciclo celular no qual a célula se encontra (SILVA, 2013; ALMEIDA et al., 2005).

Os fármacos mais utilizados na terapêutica atual podem ainda ser classificados de acordo com o mecanismo de ação em: agentes alquilantes (clorambucil), citotóxicos relacionados aos alquilantes (cisplatina), antimetabólitos (metotrexato), inibidores da topoisomerase I e II (irinotecano e tenoposíbeo), citotóxicos que se intercalam ao DNA (doxorrubicina), citotóxicos que se intercalam à tubulina (vincristina) e inibidores das tirosinases (mesilato de imantinibe) (SILVA, 2013).

Em muitos casos a quimioterapia combinada apresenta vantagens em relação à monoterapia principalmente em neoplasias malignas e nos casos em que há resistência. A associação de fármacos que atuem em mecanismos distintos proporciona respostas mais efetivas, reduz as chances de resistência e potencializa o efeito de morte celular (SILVA, 2013). Além dos fármacos tradicionais, o tratamento também pode ser feito por meio da hormonioterapia. O tratamento com hormônios se dá por meio da supressão ou potencialização dos hormônios circulantes (SILVA, 2013; INCA, 2015).

O tratamento do câncer caracteriza-se por não ser tão simples, nem fácil e muito menos barato. Para algumas pessoas, os tratamentos disponíveis também podem ser ineficazes, pois no câncer de pulmão, verifica-se alta prevalência da resistência a múltiplos fármacos, referida como a perda da sensibilidade tumoral aos agentes quimioterápicos, estruturalmente diferentes. Ainda cabe considerar que os tratamentos podem gerar muitos efeitos adversos, por isso pesquisas de métodos de tratamentos novos e também complementares precisam ser realizados (NCI, 2015; INCA 2015). A fim de aumentar as opções de tratamento e, finalmente, melhorar as taxas de sobrevida dos pacientes, é preciso ampliar o arsenal terapêutico com terapias seletivas e alternativas eficazes.

A crescente pesquisa de novas moléculas com atividade citotóxica e possibilidade do uso de plantas medicinais como antitumorais é corroborada pelo fato de que medicamentos relevantes e amplamente utilizados atualmente em tratamentos foram obtidos de plantas medicinais. Como exemplo, pode-se citar, a vincristina e vimblastina provenientes de *Cantharantus roseus*; o paclitaxel, um análogo de docetaxel oriundo de *Taxus brevifolia* Nutt. e, a camptotecina, o topotecano originários de *Camptotheca acuminata* Decne (COSTA-LOTUFO *et.al.*, 2010).

3.4. LINHAGENS CELULARES: CALU-3 E 3T3

As células Calu-3 derivam do epitélio de adenocarcinoma de pulmão, células não-pequenas (CPNPC), especificamente das glândulas bronquiais submucosas, sendo portanto consideradas um modelo de células tumorais humana (Figura 2). As células Calu-3 (células epiteliais pulmonares) são utilizadas como uma alternativa compatível *in vitro* ao epitélio respiratório e para avaliação de penetração de fármacos no pulmão. Estas células apresentam a formação de junções intercelulares justapostas, ideais para determinação da permeabilidade de compostos de baixa massa molecular. Além disso, demonstrou-se que essas células possuem a P-gp funcionalmente ativa devido a sua posição apical (HAMILTON et al., 2001; BRILLAULT et al., 2010).

As células 3T3 são originárias de uma linha celular estabelecida em 1962 por dois cientistas, então, no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Nova York, George Todaro e Howard Green. A linha celular 3T3 tornou-se a linha celular de fibroblastos padrão (Figura 2). Todaro e Green obtiveram originalmente suas células 3T3 de tecido de embrião de camundongo albino suíço.

A designação '3T3' refere-se à abreviatura de "transferência de 3 dias, inóculo 3×10^5 células". Esta linha celular foi originalmente estabelecida a partir das células primárias de fibroblastos embrionárias de camundongos que foram cultivadas pelo protocolo designado, o chamado 'protocolo 3T3'. As células primárias de fibroblastos embrionárias de camundongos foram transferidas (o "T") a cada 3 dias (o primeiro "3") e inoculadas na densidade rígida de 3×10^5 células por prato de 20 cm^2 (o segundo "3") continuamente. As células espontaneamente imortalizadas com taxa de crescimento estável foram estabelecidas após 20 a 30 gerações em cultura e depois denominadas células "3T3".

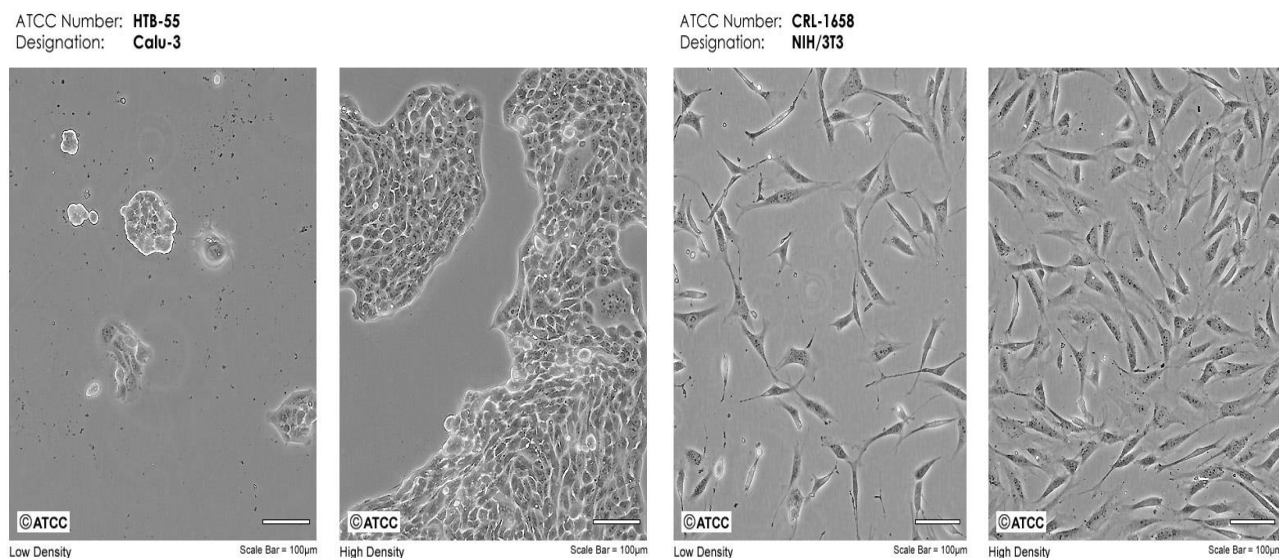


Figura 2. Células Calu-3 e células 3T3.

Fonte: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-1658.aspx>

3.5. OLÉOS ESSENCIAIS

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o Reino Vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos. A variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas ter-se-iam formado e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

No contexto da evolução das plantas terrestres, estima-se, atualmente, que cerca de 500.000 espécies ocupam todo o planeta, sendo que, 50% (250.000) são constituídas pelas angiospermas. No auge desse processo evolutivo, as angiospermas alcançaram, sem dúvida, um desenvolvimento ímpar, dada a ocorrência de micromoléculas distintas e complexas, com vários centros estereogênicos; possivelmente, devido a essas características, sejam-lhes atribuídas inúmeras finalidades alelopáticas e biológicas (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Desta forma, as plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra.

Por volta de 1990, estimou-se que cerca de 80% da população mundial procuravam nas plantas a fonte principal de medicamentos. Está comprovado hoje, que grande parte da população mundial, principalmente aquelas de países em desenvolvimento usa como medicamentos extratos ou porções oriundas de plantas (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Os óleos essenciais são definidos pela ISSO (Internacional Standart Organization) como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d' água. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas. Podem chamar também de óleos voláteis ou óleos etéreos. Geralmente são líquidos de aparência oleosa em temperatura ambiente, sua principal característica é a volatilidade além de seu aroma intenso e agradável (SIMÕES et al., 2000).

Óleos essenciais constituem-se em uma mistura muito complexa de moléculas, que variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssima quantidade (traços) (SIMÕES et al., 2000).

Com base nas suas estruturas químicas, os óleos essenciais são classificados como hidrocarbonetos de terpeno, monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), e diterpenos (C20); terpenos (terpenoides contendo oxigênio), tais como alcoóis, cetonas, aldeídos, ésteres, lactonas, e cumarinas; e fenilpropanóides e compostos aromáticos derivados a partir de fenilprofano que ocorrem com menos frequência. Monoterpenos são os constituintes mais abundantes, muitas vezes a atividade antitumoral de óleos essenciais tem sido relacionada com a sua presença no fitocomplexo (RUSSO et al., 2015).

Existe uma grande variação no perfil químico dos óleos essenciais dependendo dos métodos de extração, órgão utilizado, da idade e fase vegetativa da planta, época da colheita, bem como da composição do solo. A complexidade química contribui para os efeitos biológicos do fitocomplexo, uma vez que cada componente participa no resultado global e pode modular os

efeitos dos outros. Isso muitas vezes traduz-se no conceito de que, na maioria dos casos, não é possível atribuir os efeitos de um óleo essencial a um único componente. Portanto, estudos sobre os componentes individuais pode não relatar os resultados do efeito de tratamento com o fitocomplexo como um todo (RUSSO et al., 2015).

Os óleos essenciais apresentam frequentemente problemas de qualidade, que podem ter origem na variabilidade da sua composição, na adulteração ou falsificação, ou ainda na identificação incorreta do produto e sua origem (SIMÕES, 2000). A adulteração e mesmo falsificação de óleos essenciais já é conhecida desde os tempos mais antigos (STEINEGGER; HANSEL, 1992).

Os óleos essenciais têm sido utilizados em aromaterapia para amenizar depressão e ansiedade em pacientes com câncer (KITE et al., 1998; HADFIELD, 2001). Em casos de náuseas e vômitos provocados pela quimioterapia *Mentha spicata* L. e *M. piperita* apresentaram-se eficazes na superação destas condições eméticas (TAYARANI et al., 2013). O óleo essencial de lavanda tem sido também amplamente utilizado em aromaterapia demonstrando ser benéfico na redução do desgaste físico e mental em pacientes com câncer (SODEN et al., 2004).

Ainda neste mesmo sentido, os óleos essenciais de *Leptospermum scoparium* J.R. Forst. & G. Forst e *Kunzea ericoides* Thompson, J. foram relatados para prevenção de câncer de cabeça e pescoço quando utilizados em bocejos em pacientes submetidos radioterapia (JENNINGS et al., 2009). Alguns pacientes com câncer com metástase e úlceras tumorígenas de pele desenvolvem necrose com mau cheiro e apresentaram melhoras em seu estado pelo tratamento com uma mistura de óleos essenciais de eucalipto, melaleuca, limão, folhas de cravo, tomilho em uma base de 40% de etanol (WOLF et al., 1997).

Os óleos essenciais também têm sido explorados por apresentarem atividade antitumoral *per se*. De fato existem relatos do potencial de indução de morte celular por apoptose e/ou necrose, parada de ciclo celular e perda da função de organelas em tratamentos utilizando óleos essenciais. Este efeito é atribuído às substâncias lipofílicas e de baixo peso molecular, que poderiam

entrar facilmente pela bicamada fosfolipídica da membrana celular, aumentar a fluidez da membrana, promovendo distúrbios intracelulares como a redução da produção de ATP, perda do potencial mitocondrial, alteração do gradiente de pH, além de afetar o estado redox celular (RUSSO et al., 2015).

Segundo Gautam et al. (2014) o potencial terapêutico dos óleos essenciais está associado a diversos mecanismos relacionados à quimioprevenção e supressão do tumor resultantes da atividade antiproliferativa, indução da apoptose, aumento dos níveis de radicais livres, inibição enzimática, parada no ciclo celular, reparo no DNA e bloqueio da metástase e da angiogênese. Na Figura 3 estão apresentados alguns alvos de ação dos óleos essenciais.

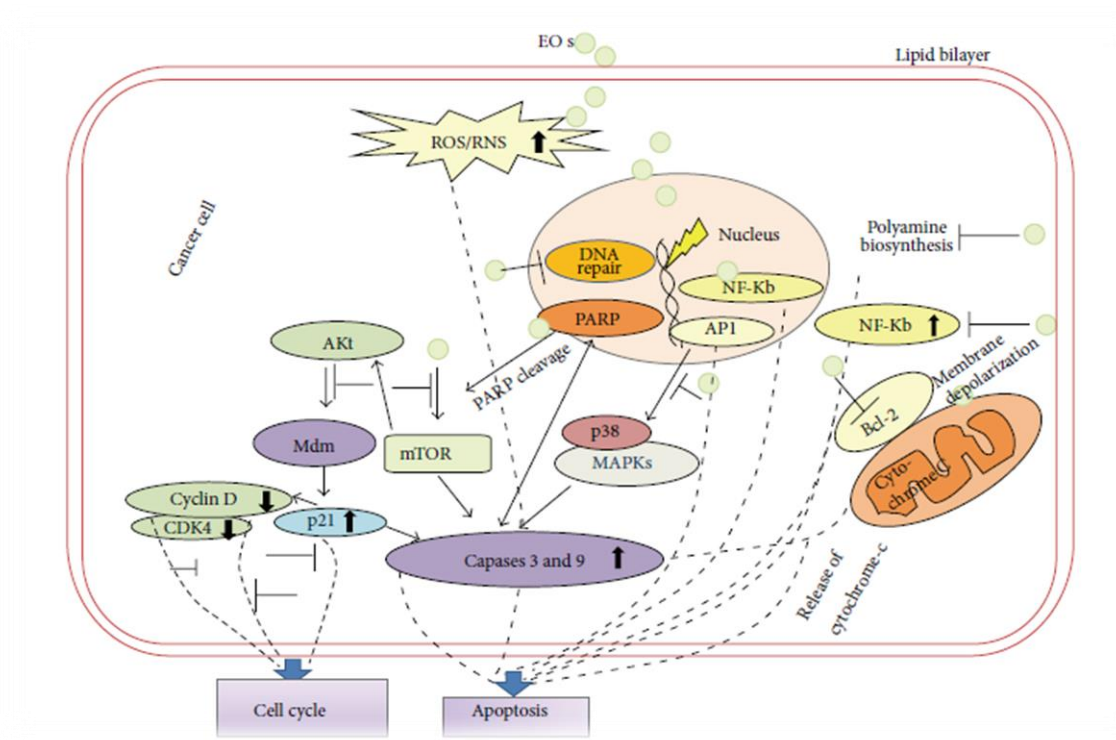


FIGURA 3: Mecanismo de ação intracelular dos óleos essenciais.
Fonte: GAUTAM et al., 2014.

Os óleos essenciais aumentam os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) resultando em apoptose celular. Inibição das vias de sinalização Akt, mTOR, e MAPK em diferentes etapas que resultam em *up / down regulation* de várias biomoléculas importante e os genes correspondentes. A alteração na expressão de NF-κB pelo OE e de sua ligação

ao DNA induz apoptose. Desfosforilação de Akt pela ação de OE resulta em maior expressão de p21, a qual ou induz apoptose, por aumento de caspases ou resulta em interrupção do ciclo celular pela ligação de ciclinas. Os OE induzem estresse mitocondrial que leva a ativação de Bcl-2 e despolarização da membrana mitocondrial, resultando em maior liberação de citocromo-C para o citoplasma que induz apoptose. OE também podem modular os mecanismos de reparo do DNA, atuando como inibidores da DNA polimerase e conduzem a clivagem de PARP o que também resulta em apoptose das células (GAUTAM et al., 2014).

Gautam et al., (2014) relatou que existe na literatura muitos estudos sobre a atividade antitumoral de óleos essenciais e seus constituintes. Pesquisas *in vitro* e *in vivo* têm mostrado resultados efetivos dos óleos essenciais das mais diversas espécies vegetais, contra câncer de boca, pulmão, mama, próstata, fígado, colón, cérebro e leucemias, sendo alguns destes achados apresentados na Tabela 1 (GAUTAM et al., 2014; RUSSO et al., 2015).

TABELA 1. Resultados efetivos de óleos essenciais estudados em sua fase líquida, onde observa-se os OE utilizados, órgão afetado e respectivas linhagens celulares utilizadas (GAUTAM et al., 2014; RUSSO et al., 2015).

ÓLEO ESSENCIAL	ÓRGÃO AFETADO	LINHAGEM CELULAR
<i>Melissa officinale</i> L.	Pulmão, cólon, mama e leucemia	HL-60 e K562
<i>Salvia</i> sp	Melanoma humano, hepatoma	A357 e A2058
<i>Syzyguima romaticum</i> L.	Mama, próstata, cervix uterino, esôfago	MCF-17, MDA-MB-231, DU-145, HeLa e TE-13
<i>Eucalyptus</i> sp	Hepatocelular humano, mama	HepG2, MCF7
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Leucemia, linfoma, hepatocelular, cólon	HL-60, U-937, HepG2, e SNU-C5

Seal et al. (2012), mostrou que a vaporização de óleos essenciais induz a morte de células tumorais em cultura, sendo seu estudo um dos primeiros a relatar o efeito antitumoral da fase vapor de óleos essenciais (semente de *Litsea cubeba* Lour.) em células de pulmão A549. De fato, relatos de efeitos biológicos

da fase vapor de óleos essenciais ainda são escassos na literatura. No entanto, em relação ao sistema respiratório Selvarini e James (2013) relataram que o vapor das folhas de cedro *Thuja plicata D.Dom* foi capaz de inativar vírus causadores de viroses respiratórias, afirmando que o vapor não foi citotóxico para células pulmonares A549.

Verifica-se ainda, que no tratamento do câncer, existe uma barreira que o torna extremamente complicado, a resistência a múltiplos fármacos, ou seja, as células cancerígenas podem perder a sensibilidade aos agentes quimioterápicos estruturalmente diferentes (NOOTERAND; HERWEIJER, 1991; SODEN *et al.*, 2004; ULLAH *et al.*, 2008). Esta resistência surge devido aos diferentes mecanismos, como: a indução de reparo do DNA danificado em resposta as drogas; em mudança na capacidade de absorção da droga; alteração do nível e da resposta das enzimas alvo; aumento da sua atividade do transporte das proteínas da família ABC (SARKADI *et al.*, 2006). Óleos essenciais podem contornar esta refratariedade dos tumores aos fármacos citotóxicos (M'BAREK *et al.*, 2007).

Neste sentido, a busca por substâncias naturais que sensibilizem as células para a ação dos medicamentos é uma área a ser explorada pela ciência (BERDOWSKA *et al.*, 2013; GAUTAM *et al.*, 2014). Assim, tratamentos complementares e alternativos, utilizando óleos essenciais, tem recebido maior atenção como nova modalidade terapêutica (MACHADO; FERNANDES JUNIOR, 2011).

3.6. *JASMINUM OFFICINALE*

Jasminum officinale é um arbusto perene, cresce às vezes torcendo-se ou buscando suporte, com altura de cerca de dois a três metros. Suas folhas são verdes, decíduas, ovais e arredondadas na base, com até cinco centímetros de comprimento. O caule e as folhas são cobertas com uma pilosidade que dá à planta uma aparência geral cinzento-verde. Ramos longos, fracos, escassamente peludos quando jovens, possuem 5-10 cm de comprimento, opostos, imparipinates, pecíolo e nervo médio estreitamente marginalizados. Folhas com superfície superior ligeiramente pubescente, especialmente no nervo central e nas margens, folhas laterais agudas ou apiculadas, sésseis ou

subséssil, o par superior às vezes com bases ovado ou lanceolado, acuminado. flores perfumadas, corola branca (PATIL ; SHAHBAA, 2015).

São nativas e cultivadas nas regiões quentes da Ásia. Na Figura 4 podemos observar imagens das flores de *Jasminum officinale*.



FIGURA 4: Foto das flores de *Jasminum officinale*.

Fonte: http://www.waitrosegarden.com/plants/_/jasminum-officinale/classid.1668/

Atualmente a extração do OE de *J. officinale* se dá através do método de extração por solventes. Com relação ao seu rendimento, são necessários 1kg de flores para se obter 1,5 g de óleo essencial, o que o torna um óleo de elevado valor comercial.

A triagem fitoquímica da estimativa qualitativa das plantas estudadas mostrou que *Jasminum officinale* é rico em fontes de metabólitos ativos medicinalmente. Seus componentes químicos já descritos na literatura são: saponinas, alcalóides, flavonóides, esteróides e saponinas, emodina, cumarinas, antocianinas. Mais especificamente estão presente em *J. officinale*, o alcaloide jasmine (cis-jasmone) (composto ativo principal), ácido salicílico, indol e álcool (PATIL ; SHAHBAA, 2015).

Numerosos estudos fitoquímicos de outras espécies de *Jasminum*, e seus muitos produtos naturais têm sido relatados. Por exemplo, os glicosídeos iridóides, secoiridóides têm sido estudados extensivamente como marcadores quimiotaxonômicos para este gênero (JENSEN et al., 2002). Outros estudos investigaram alcalóides (HART et al., 1968), glicosídeos fenilpropanóides (HUANG et al., 2008) e glicosídeos flavonóides (TANAHASHI et al., 1997).

Tradicionalmente o óleo essencial de *J. officinale* é utilizado como analgésico, antidepressivo, anti-inflamatório, antisséptico, afrodisíaco, sedativo e expectorante. Óleo absoluto de *J. officinale* é utilizado em tratamentos de processos inflamatórios e para tonificar a pele (FATOUMA et al., 2010).

O uso farmacológico das flores mostra-se como tônico, adstringente, anestésico e sedativo. Extratos de E de *J. officinale* também possuem atividade antidepressiva do sistema nervoso. O aroma do OE de *J. officinale* é descrito como calmante e relaxante. Além disso, o extrato etanólico de *Jasminum sp* apresenta efeito antibiótico sobre a febre tifoide e infecções por estafilococos. As flores além de serem afrodisíacos, podem ser utilizadas como antisséptico e antiespasmódico (FATOUMA et al., 2010).

Observou-se também o uso de *J. officinale* em infecções urinárias e como diurético. Em estudo realizado por Patil (2012) verificou-se a atividade de *J. officinale* contra ambas as bactérias gram-positivas e gram-negativas podendo indicar a presença de antibióticos de amplo espectro (quando comparados com os antibióticos convencionais em diferentes meios de crescimento) ou compostos de toxinas metabólicas em geral. *Jasminum officinale* demonstrou atividade contra as bactérias mais prevalentes gram-negativas em infecções do trato urinário.

O potencial antioxidante de *Jasminum sp* também foi explorado, o gênero de *Jasminum nervosum*, foi utilizado (hastes da planta) para investigar sua eficácia na captura de radicais livres, e apresentou bons resultados, todavia os autores não isolaram ou identificaram qualquer um dos constituintes antioxidantes (HUO et al., 2011). Um segundo estudo do mesmo grupo, utilizando cromatografia gasosa de massa (GC-MS) , os autores identificaram 68 constituintes voláteis a partir das folhas de *J. nervosum*, descobriram que beta-linalol foi o principal constituinte volátil, compreendendo cerca de 26% dos voláteis totais (HUO et al., 2011).

Quanto ao efeito antitumoral do OE de *J. officinale*, os relatos na literatura são escassos e insipiente, o trabalho de Kalaiselvi et al., (2012) destaca-se como referência, os autores estudaram *in vivo* e *in vitro* os efeitos do gênero *Jasminum sambac* sobre o linfoma de camundongo. Existem relatos de que *Jasminum dispersum* e *Jasminum officinale* apresentem atividade anticancer para carcinoma de nasofaringe de humanos (DHAWAN, 1980), todavia não encontramos relatos do efeito da fase vapor do óleo essencial em células tumorais.

4. METODOLOGIA

4.1. FÁRMACOS, REAGENTES E SOLVENTES

Os principais fármacos, reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram: meio RPMI1640 (Vitrocel), soro fetal bovino (Vitrocel), L-glutamina (Biotec), piruvato sódico (Sigma-Aldrich), iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich), penicilina (Vitrocel), estreptomicina (Vitrocel), bicarbonato sódico (Biotec), azul de tetrazólio MTT (Sigma-Aldrich), sulfarodamina-B (Sigma Aldrich), alaranjado de acridina (Sigma-Aldrich), brometo de etídeo (Sigma-Aldrich), Curcumina (Sigma-Aldrich), Rodamina123 (Sigma-Aldrich), óleo essencial de *J. officinale* (Quinaris).

4.2. ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Jasminum officinale* POR CROMATOGRAFIA GASOSA

O óleo essencial de *J. officinale* utilizado neste trabalho foi adquirido na casa de essências Quínari, situada na cidade de Ponta Grossa (PR). O produto de origem francesa é descrito como sendo um líquido amarelo-alaranjado de fragrância rica e de odor floral, obtido por extração com solventes das flores de *Jasminum officinale*.

A análise da composição química do óleo essencial de *J. officinale* foi realizada pela Central de Análise do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS) através do método de cromatografia gasosa (CG), que corresponde a um processo de análise imediata por migração diferencial dos componentes de uma mistura, dentro do sistema cromatográfico, cujo princípio envolve a separação dos componentes de um líquido, o qual é volatilizado em uma coluna cromatográfica.

O parâmetro utilizado foi o tempo de retenção dos componentes, definido como o tempo transcorrido desde a injeção da amostra até o máximo do pico gerado. Na análise quantitativa a área de cada pico no cromatograma é proporcional à concentração do componente na amostra (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

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

4.3. TRATAMENTO CELULAR

O OE de *Jasminum officinale* foram armazenadas em tubos eppendorf de 1,5 mL a 4°C. Para o preparo da solução do óleo essencial utilizado nos experimentos, inicialmente foi calculado a densidade do óleo essencial de *J. officinale* ($D = \frac{m(g)}{v(mL)}$), $D = 0,988\text{g/mL}$. Preparou-se a solução mãe do óleo à 100mg/mL sendo este solubilizado em 180 µl solução veículo (propileno glicol 25% e etanol PA. 75%) e salina (NaCl 0,9%), a partir desta solução obteve-se posteriormente as demais concentrações.

4.4. LINHAGENS CELULARES e CONDIÇÕES DE CULTIVO

As células Calu-3 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Katia Sabrina Paludo (UEPG). As células 3T3 número CRL-1658 foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*) e foram gentilmente cedidas pelas Prof^a Dr^a Patricia Mathias Doll Boscardi (UEPG). Ambas as células foram cultivadas rotineiramente em meio RPMI 1640, pH 7,4, contendo 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 0,002g/mL de bicarbonato de sódio, suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) e 10.000 U de penicilina e 10/mg de estreptomicina por litro de meio. As culturas foram mantidas em estufa a 37° C com pressão de CO₂ a 5%.

Para os tratamentos celulares foi utilizado a metodologia descrita por Seal et al., 2012 com modificações. As células Calu-3 e 3T3 foram semeadas na concentração de 2×10^4 células/mL em placas de 48 poços e colocadas para

aderir no período de 24 horas, sendo semeados 16 poços da placa com 500/ μ L da suspensão de células, ou seja, 1×10^4 células/poço. Após o período de 24 horas foram adicionados aos 32 poços restantes 500/ μ L solução salina 0,9% nos tratamentos controles e 500/ μ L da solução salina 0,9% contendo o óleo essencial de *J. officinale* em diferentes concentrações 250, 500, 750, 1000 e 2000 μ g/mL. Nas culturas 3T3 foram acrescentados mais dois tratamentos de 4000 e 6000 μ L/mL de óleo essencial de *J. officinale*. As placas de culturas foram incubadas por 72 horas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂, período de tempo correspondente aos tratamentos celulares.

Cabe destacar que estes poços que continham os tratamentos, circundavam os poços em que foram semeadas as células, conforme demonstrado na Figura 5, ou seja, as células não ficaram em contato direto com as soluções de óleo essencial. Nos poços com a letra O, foram colocadas as soluções do óleo essencial de *J. officinale* e nos quadrados cheios indicados foram semeadas as células. Para cada experimento foi preparado uma placa controle e uma placa para cada concentração do óleo essencial de *J. officinale* testada.

Os tratamentos de 72 horas constituíram os denominados ensaios tipo dose-resposta, e para ensaios tempo-resposta, as células Calu-3 foram cultivadas nas mesmas condições por períodos de 24, 48 e 72 horas utilizando-se a concentração de óleo essencial que reduziu a viabilidade celular em 50%, que correspondeu a 1000 μ g/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○							○
C	○		○	○	○	○		○
D	○		○	○	○	○		○
E	○							○
F	○	○	○	○	○	○	○	○

FIGURA 5: Modelo ilustrativo de semeadura das células Calu-3 e 3T3 em placas de cultivo de 48 poços para determinação da citotoxicidade da fase vapor do OE de *J. officinale*

4.5. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Jasminum officinale* EM CÉLULAS CALU-3 E 3T3

Para avaliar a citotoxicidade do vapor do OE de *J. officinale* foram realizados dois diferentes métodos que determinam a viabilidade celular, (1) ensaio de redução do MTT e (2) o ensaio da Sulfarodamina-B.

4.5.1. ANÁLISE METABÓLICA DA DESIDROGENASE MITOCONDRIAL: MÉTODO COLORIMÉTRICO DO MTT

Após o período de tratamento, o meio de cultivo foi retirado e desprezado, 200µL de uma solução de azul de tetrazólio (MTT) a 0,5 mg/mL foi adicionada nos poços que continham as células, seguindo a metodologia descrita por Mosmann (1983). Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C durante 2 horas, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais de formazan. Após este período foi retirado o sobrenadante (solução de MTT) e na sequência os cristais formados foram solubilizados em 200 µL de dimetilssulfóxido (DMSO). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 550 nm, em leitora de placas (Biotek, µQuant). Para o cálculo da viabilidade celular (%) utilizou-se a equação abaixo.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Absorbância média das amostra} \times 100}{\text{Absorbância média do controle}}$$

Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da concentração do óleo essencial de *J. officinale* eficaz para inibir 50% de crescimento celular (IC₅₀). A IC₅₀ foi obtida por meio da análise de Probit conforme descrito no item análises estatísticas.

4.5.2. ENSAIO DA SULFARODAMINA-B

Para a análise da Sulfarodamina-B (SRB), utilizou-se a metodologia descrita por Papazisis et al., 1997 (modificada). Decorrido a incubação de tratamento, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 200 µL de tampão de fosfato de sódio (PBS) pH 7,4. Em seguida, foram adicionado 200 µL de ácido tricloroacético 10% (v/v) gelado e as placas foram colocadas na geladeira por 30 minutos, para fixação das células. Após, as células foram lavadas três vezes com 200 µL de água destilada e colocadas para secar por 24 horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi adicionado 200 µL de uma solução de SRB 0,2% e aguardado 30 minutos. Na sequência, as placas foram lavadas (5x) com 200 µL de ácido acético 1% e foram colocadas para secar por 30 minutos. Após este período foi adicionado 150 µL de TrisBase 10/mM (preparado em água) e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 432 nm, em leitora de placas (Biotek, µQuant). Para o cálculo da viabilidade celular (%) utilizou-se a equação abaixo.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Absorbância média das amostra} \times 100}{\text{Absorbância média do controle}}$$

4.6. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO E BUSCA PELO MECANISMO DE AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL de *Jasminum officinale* EM CÉLULAS CALU-3

Para elucidar as respostas da ação do vapor do óleo essencial de *J. officinale* associado à citotoxicidade foram utilizados tratamentos com a concentração de 1000 µg/mL-1 e foram avaliados: (1) processo de morte induzida pelo óleo essencial utilizando os ensaios de análise morfológica com o emprego dos fluoróforos alaranjado de acridina e brometo de etídio, (2) distribuição porcentual das células nas fases do ciclo celular com emprego de iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo. Relacionado ao mecanismo de ação foi investigado o potencial inibidor da fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* sobre a proteína resistente a fármacos, glicoproteína P empregando o ensaio de acúmulo de Rodamina 123.

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

Em placas de 24 poços foram semeadas as células Calu-3 sobre lamínulas na concentração de 5×10^4 células/poço em meio de cultura RPMI 1640 conforme descrito no item 4.4. Após 24 horas de adesão celular, foram adicionados aos poços desprovidos de células 1000/µL solução salina 0,9% nos tratamentos controles e 1000 µL da solução salina 0,9% contendo o óleo essencial de *J. officinale* (1000 µg/mL). As células então foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após este período de tratamento, os poços foram lavados com 200 µL de tampão de fosfato de sódio pH 7,4 e em seguida foram adicionados 10 µL da mistura de corantes alaranjado de acridina (AO) com brometo de etídio (BE) (200 µg de cada corante/mL) sobre as lamínulas e estas colocadas invertidas sobre lâminas. A coloração foi visualizada em microscópio óptico de fluorescência Olympus BX41 (filtro com excitação de 480/30 nm e emissão 535/40 nm) e os campos foram registrados com câmera fotográfica Olympus DP71 acoplada.

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

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

Uma quantificação das células viáveis, apoptóticas e necróticas foi realizada pela contagem celular total a partir das imagens fotográficas em aumento de 200x. Foram contadas todas as células por campo e os resultados foram expressos em porcentagem.

4.6.2. ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Para a análise do ciclo celular, as células Calu-3 também foram semeadas de acordo com os padrões estabelecidos nos demais experimentos. Após 24 horas de tratamento com óleo essencial de *J. officinale* na concentração de 1000 µg/mL, as células foram coletadas e lavadas com tampão de fosfato de sódio pH 7,4 (1x). Para analisar a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, estas foram ressuspensas em 200 µL de uma solução de lise PSSI (50 µg/mL PI, 0,1% Triton X-100 e 50 µg/mL RNase) em tampão de fosfato de sódio pH 7,4 conforme descrito por Nicolleti e colaboradores em 1997. Após 30 minutos, período mínimo, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCanto II da Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa Diva (Becton & Dickinson), avaliando uma média aproximada de 20.000 eventos por amostra.

4.6.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA P - ENSAIO DE ACÚMULO DE RODAMINA 123

O ensaio de acúmulo intracelular de rodamina 123 é um método indireto para dosagem da atividade da glicoproteína-P (LE VEE et al., 2015). Resumidamente as células (1×10^5 células/mL) foram incubadas por 24h na presença ou na ausência da fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* (1000 µg/mL). Após este período de tratamento o meio de cultivo foi retirado e desprezado, e foi acrescentado na metade dos poços contendo as células 1000

μL de solução de rodamina 123 (5,25 μM) por poço, e na outra metade dos foi acrescentado 1000 μg/mL rodamina (5,25 μM) e curcumina (10 μM) por poço. Em seguida as células foram incubadas em estufa a 37°C, CO₂ 5% por 30min. Após as células foram lavadas com tampão de fosfato de sódio pH 7,4 e, posteriormente lisadas com água. O acúmulo intracelular de rodamina 123 foi determinado por espectrofluorimetria (485 e 535 nm). Os dados foram expressos em % de acúmulo de rodamina 123.

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software estatístico GraphPadPrism versão 5.03 (San Diego, CA, EUA). Neste trabalho foram empregados teste de Mann-Whitney e análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida teste POST-HOC de Tukey. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) ou média ± desvio padrão (DP). Valores de *p* menores do que 0,05 (*p*<0,05) foram considerados como indicativos de significância.

A citotoxicidade foi expressa como a concentração da amostra que induziu morte celular de cerca de 50% das células (IC₅₀) e foi calculada por regressão de Probit, método de Finney, utilizando o Software estatístico StatPlus version 5.8.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL de *Jasminum officinale* POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Uma amostra do óleo essencial de *J. officinale* utilizado neste estudo foi encaminhada para análise por cromatografia gasosa à Central de Análises do Instituto de Biotecnologia Universidade de Caxias do Sul (UCS). A composição química do óleo essencial de *J. officinale* está mostrada na tabela 2. Na figura 6 está apresentado o cromatograma do óleo essencial de *J. officinale* onde observa-se os picos dos compostos presentes e por conseguinte seu tempo de retenção.

Tabela 2. Porcentagens dos compostos presentes no óleo essencial de *J. officinale* quantificados através da cromatografia gasosa.

COMPOSTOS	% Rt (min)
α -toluenol	8,91
Acetofenona	0,37
Linalol	8,63
benzil carbinol	1,88
acetato de benzila	31,43
α -terpineol	1,96
γ -terpineol	0,39
antranilato de linalila	3,37
Nerolin	1,00
Salvanol	1,96
cinnamaldehyde, α -hexil (jasmonol)	30,49
benzoato de benzila	2,55

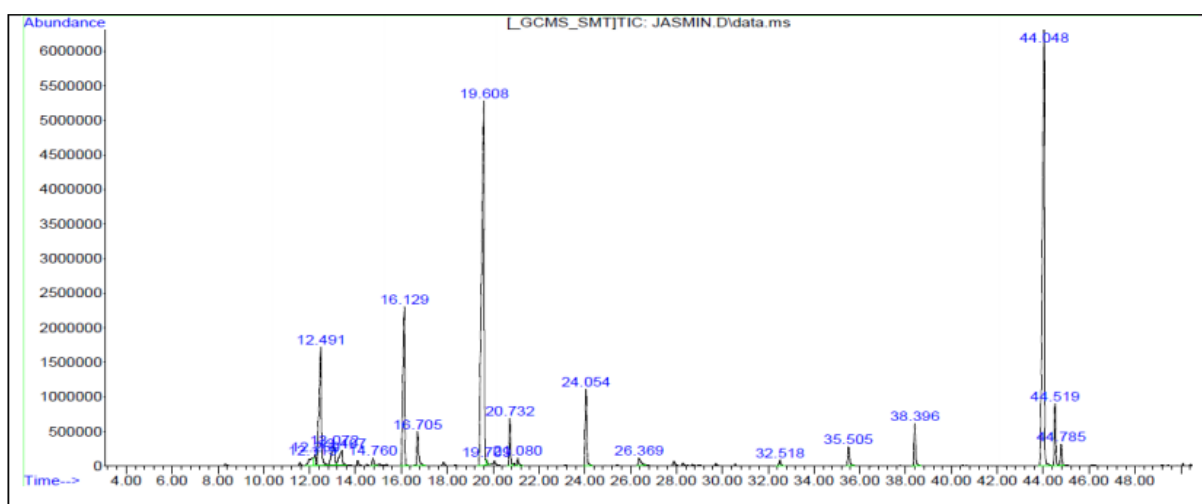


FIGURA 6. Cromatograma do OE de jasmim obtido por CG-MS.

Quanto a composição química, os óleos essenciais apresentam variações ditas naturais, não somente na composição, mas também quanto a qualidade, devidas as condições de crescimento, clima, condições de colheita e partes de plantas selecionado para a extração. Os métodos de extração e condições de armazenamento, tais como exposição ao oxigênio, temperatura e a luz, também podem afetar a integridade dos OE (NAMKOONG *et al.*, 2017).

Existem padrões estabelecidos com base em estudos analíticos para alguns óleos essenciais, porém para a grande maioria não existe padrão definido, portanto se faz necessário estabelecer a composição/identidade e

pureza do óleo essencial para garantir a sua qualidade e prevenir adulteração (NAMKOONG *et al.*, 2017). De fato, a adulteração e mesmo falsificação de óleos essenciais já é conhecida desde os tempos mais antigos (STEINEGGER; HANSEL, 1992). Segundo Simões (2005) alguns dos procedimentos usados para falsificar óleos essenciais são: (1) adição de compostos sintéticos, de baixo preço, tais como álcool benzílico, ésteres do ácido ftálico e até hidrocarbonetos clorados; (2) mistura de óleos essenciais de qualidade com outros óleos de menor valor para aumentar o rendimento e (3) adição das substâncias sintéticas outras.

Dos métodos analíticos mais utilizados para avaliar a qualidade dos óleos essenciais destaca-se o GC (Cromatografia gasosa) (NAMKOONG *et al.*, 2017). A análise cromatográfica (CG) do óleo essencial *J. officinale* utilizado neste estudo revelou como compostos majoritários acetato de benzila com 31,43% e o jasmonal (α -hexilcinamaldeído) com 30,49%, além de compostos minoritários como α -toluenol com 8,91%, linalol com 8,63%, antranilato de linalila 3,37%, benzoato de benzila 2,55%, α -terpineol 1,96%, salvanol 1,96%, benzil carbinol 1,88%, nerolin 1,00%, γ -terpineol 0,39% e acetofenona com 0,37%.

O acetato de benzila é encontrado naturalmente em muitas flores, caracteriza-se por ser um líquido água-branco com odor à pera, é um constituinte natural de vários óleos essenciais extraídos de jasmim, jacinto, gardênia, tubérculos, ylang-ylang, cananga e neroli. Juntamente com o linalol, o acetato de benzila garante o odor típico do óleo de jasmim (YE *et al.*, 2015).

Pragadheesh e colaboradores (2011) identificaram um total de 23 compostos orgânicos voláteis de flores de *J. Sambac* e relataram que a maior proporção da fragrância era constituída por acetato de cis-3-hexenila, α e β -cimeno, linalol, acetato de benzila e α -farneseno. Bera e colaboradores (2017) identificaram 49 compostos em flores de quatro espécies de *Jasminum*, onde linalol e α -farneseno foram o principal monoterpene e sesquiterpene em flores de jasmim, e o acetato de benzila foi o benzenóide mais abundante. Os autores indicaram ainda que o perfume floral de *J. sambac* inclui três principais ésteres de benzenóides: acetato de benzila, benzoato de metila e salicilato de metila e três terpenos: β -ocimeno, linalol e α -farneseno.

Demole e colaboradores (1962) em um trabalho descreveram a composição do óleo essencial da flor de *J. officinale* encontrada na literatura

desde 1899, segundo os autores foram identificaram para a espécie de *Jasminum grandiflorum* L. os constituintes: acetato de benzila, acetato de linalila, linalol, benzil álcool, indol, antronilato de metila e metil-jasmone. Os autores ainda comentam que também foram identificados no óleo essencial de *J. officinale* *p*-cresol, geraniol, farnesol, eugenol, ácido benzoico, benzaldeído, α -terpineol, nerol, dentre outros. Nankoong e colaboradores (2017) descrevem que os componentes voláteis típicos dos óleo essencial de *J. officinale* incluem acetato de benzila, álcool benzílico, citronelol e metil-jasmone. Segundo os autores o metil-jasmone é um componente marcador/crítico do óleo essencial de *J. officinale*, os quais ainda mencionam que existem óleo essencial de *J. officinale* com diferentes qualidades disponíveis a partir de vários fornecedores e dentre esses muitos apresentam os cinamaldeídos com picos do tempo de retenção de 35,6 minutos, próximo ao metil-jasmone. Neste sentido o segundo composto majoritário do óleo essencial de *J. officinale* revelado pela CG foi α -hexilcinamaldeído (HCA) com 30,49%, o que nos permite inferir que o óleo empregado neste estudo não seria puro apresentando menor qualidade. Nankoong e colaboradores (2017) denominam esses óleos essenciais como óleos essenciais alternativos, em face da adição deste composto semissintético.

O α -Hexilcinamaldeído é um composto de aroma floral de canela e jasmim, sendo também denominado de jasmonal, bastante utilizado pela indústria cosmética e adicionados a perfumes, cremes, xampus. Quanto a sua estrutura química, é um aldeído α , β -insaturado, devido à presença de um carbono-oxigênio polarizado em uma ligação dupla e uma ligação dupla adicional entre os carbonos 2 e 3 (α e β , respectivamente), o que torna o composto mais reativo do que um aldeído simples, apresentando peso molecular correspondente a 216,32 (Figura 7).

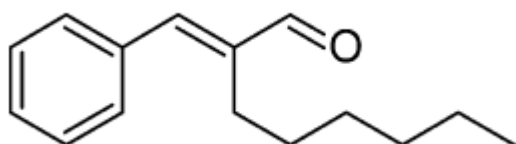


FIGURA 7: Estrutura química do α -Hexilcinamaldeído (HCA).

Este composto é um derivado semissintético de cinamaldeído (Aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal), um aldeído aromático encontrado como o principal componente (60-75%) de óleos essenciais da casca de canela (*Cinnamomum* spp., Lauraceae), que apresenta propriedades benéficas incluindo atividade antiproliferativa, pró-apoptóticas e efeitos antimutagênicos (GIACOMO *et al.*, 2016). Apesar dos efeitos protetores, a alta reatividade do composto e baixa estabilidade química, impede sua aplicação clínica, o que conduz à derivação em α -hexilcinamaldeído, dentre outros compostos.

Como mencionado o α -hexilcinamaldeído é um aldeído sintético, e a presença de estruturas aldeídicas sempre remete a necessidade de confirmação de biossegurança. Neste sentido, Di Sotto e colaboradores (2013), avaliaram potencial mutagênico e genotóxico do composto, por meio dos ensaios de mutação reversa bacteriana, cromossômico/de micronúcleo e ainda verificaram presença danos ao DNA (ensaio Cometa) e concluíram que o composto α -hexilcinamaldeído não causa mutagenicidade e genotoxicidade. Segundo os autores estes achados respaldam a segurança do composto e, portanto seu emprego como substância com potencial atividade antitumoral.

Outro aspecto que respalda o emprego do α -hexilcinamaldeído como antitumoral é a sua capacidade para interagir com biomembranas e modular as suas permeabilidades, evento que foi investigado por Sarpietro e colaboradores (2015) como uma estratégia para reverter à resistência multidrogas (MDR) em células cancerígenas. O α -hexilcinamaldeído distribui-se uniformemente na bicamada lipídica intercalando-se entre os fosfolipídios desempenhando papel de prevenção da perda de integridade estrutural da biomembrana reduzindo o efluxo de drogas citotóxicas, ou seja, reversão da MDR. Considerando ainda que a MDR é estritamente regulada por sinalização redox, os autores avaliaram os efeitos pró-oxidantes e/ou antioxidantes do composto. Tanto em ambiente lipofílico quando hidrofílico o α -hexilcinamaldeído não produz nenhum composto pró-oxidante, porém inibe a oxidação, o que permitiu atribuir ao composto o possível papel quimipreventivo e quimissensibilizante.

Em relação aos compostos minoritários do óleo essencial de *J.officinale* empregado, vários estudos relataram o potencial anticancerígeno do linalol que perfaz 8,63% do óleo essencial. O linalol foi citotóxico para as linhagens

celulares de tumores gástrico, de pulmão, e de pele (CHENG *et al.*, 2007). Alguns desses estudos reportam que linalol induz apoptose (CHENG; GU, 2010), estresse oxidativo (USTA; SRITHAR, 2013) e é imunomodulador (CHANG, 2014). Iwasaki (2016) verificou que o linalol induziu a apoptose de células de câncer de cólon humano por meio do estresse oxidativo.

Um segundo composto minoritário, α -terpineol presente no óleo essencial em menor proporção (1,96%), foi também relatado por alguns autores como potencial agente anticancerígeno. Hassan e colaboradores (2010) demonstrou que o α -terpineol induz a apoptose de células HCT-116 (câncer de cólon), por meio da liberação de citocromo C, clivagem PARP e de ativação de caspase. O α -terpineol também foi relatado por inibir a proliferação de MCF-7 e HeLa por resultado da supressão da via de sinalização de NF-kB (INDRASETIWAN *et al.*, 2012). Além disso, o α -terpineol demonstrou ser citotóxico para as linhagens celulares de T47D e HeLa por induzir a apoptose celular e gerar parada de ciclo celular (RASUANE; 2014). Candrasari e colaboradores (2012) demonstraram que o α -terpineol interfere no ciclo celular da linhagem MCF-7, gerando acúmulo de células em sub-G0 e ainda induz apoptose pela diminuição da expressão de Bcl-2 e o aumento de Bax.

5.2. DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE e IC₅₀ DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Jasminum officinale* EM CÉLULAS CALU-3 E 3T3

O efeito da fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* sobre a viabilidade celular da linhagem Calu-3, nas concentrações 250, 500, 750, 1000 e 2000 µg/ml está demonstrado na Figura 8.

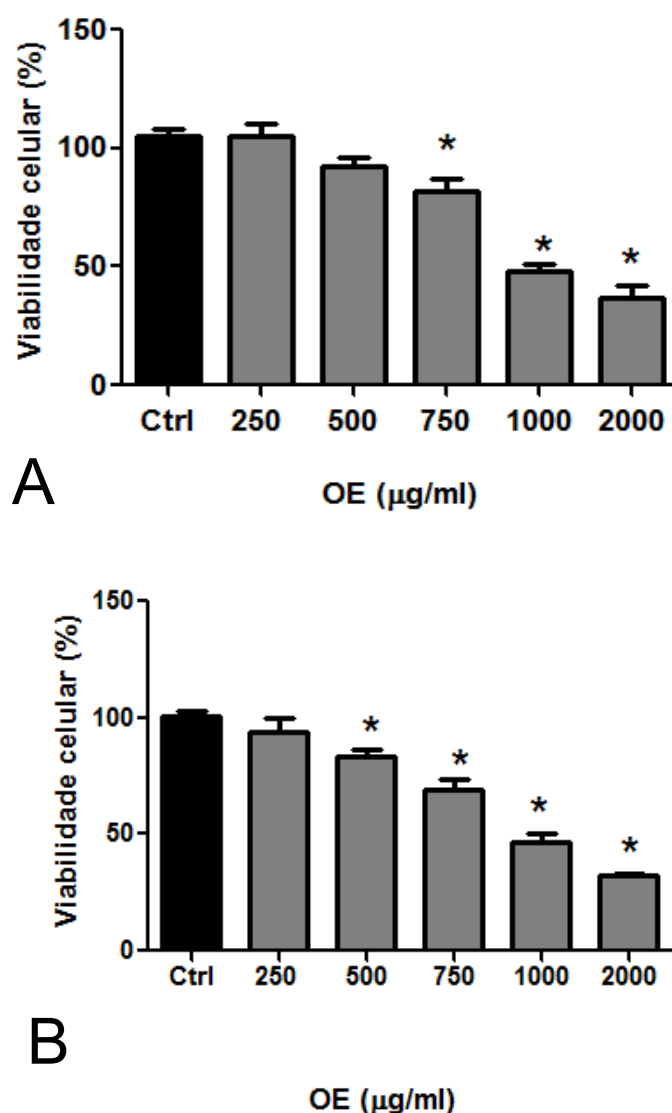


FIGURA 8: Efeito da fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* sobre células Calu-3 (72h). A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (A) e SRB (B). Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes, com $n=4$ por ensaio. Os símbolos * representam diferença significativa em relação ao controle obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ($p < 0,05$).

Para o ensaio de redução do MTT, após 72h de incubação com óleo essencial foi observado redução na viabilidade celular de maneira dose-dependente. Todavia somente nas concentrações de 750, 1000 e 2000 µg/mL verificou-se ação citotóxica significativa em relação ao controle ($p < 0,05$), onde foram observadas as respectivas porcentagens de redução de viabilidade celular, 18%, 52% e 63%.

O ensaio da SRB corroborou o ensaio de redução MTT, após 72h de incubação com óleo volátil, também observou-se redução na viabilidade celular., todavia a partir da concentração de 500 µg/mL, seguida de 750, 1000 e 2000 µg/mL, todas com efeito citotóxico significativo em relação ao controle ($p<0,05$). Respectivamente as porcentagens de redução de viabilidade celular foram 17%, 31%, 54% e 68%.

O efeito da fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* sobre a viabilidade celular da linhagem 3T3, nas concentrações 250, 500, 750, 1000, 2000, 4000 e 6000 µg/mL está demonstrado na Figura 9.

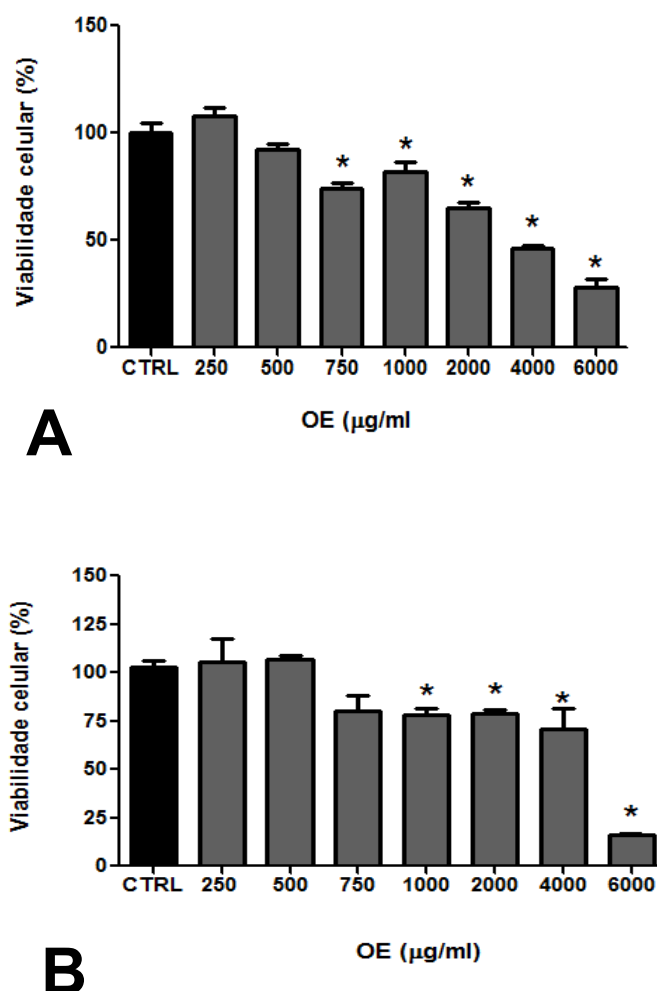


FIGURA 9: Efeito da fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* sobre células 3T3 (72h). Viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (A) e SRB (B). Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. Os símbolos* representa diferença

significativa obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ($p < 0,05$).

Após 72h de incubação com óleo essencial foi observado redução na viabilidade celular significativa nas concentrações 750 a 6000 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$), com 25,8% de redução de viabilidade na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$, 18,23%, em 1000 $\mu\text{g/mL}$, 34,67%, em 2000 $\mu\text{g/mL}$, 53,59% em 4000 $\mu\text{g/mL}$ e de 71,86% na concentração de 6000 $\mu\text{g/mL}$.

O ensaio da SRB revelou o mesmo perfil de resposta que o observado no ensaio de redução de MTT. Todavia com diferença significativa de redução celular a partir da concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo observadas as seguintes porcentagens de redução de viabilidade celular, para concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de 22%, 2000 $\mu\text{g/mL}$ 21%, 4000 $\mu\text{g/mL}$ 29% e para 6000 $\mu\text{g/mL}$ de 84%.

Utilizando os resultados de viabilidade celulares obtidos por meio do ensaio de redução do MTT, foi calculado o valor de IC_{50} para a fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* para ambas as células. Para células Calu-3 o IC_{50} calculado foi a 1495,57 $\mu\text{g/mL}$ e para as células 3T3 foi de 3795,05 $\mu\text{g/mL}$. A partir do valor de IC_{50} observou-se que a fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* é 2,54 mais citotóxica para as células Calu3 quando comparado com as células 3T3.

Para avaliar a influência do período de tempo de tratamento na viabilidade celular de Calu-3, realizaram-se os ensaios de redução do MTT e SRB após 24, 48 e 72 horas de exposição a fase vapor do óleo essencial de *J. officinale*. O efeito do óleo essencial foi avaliado empregando-se a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. A viabilidade celular da linhagem Calu-3, nos diferentes períodos de tempo, está demonstrada na Figura 10.

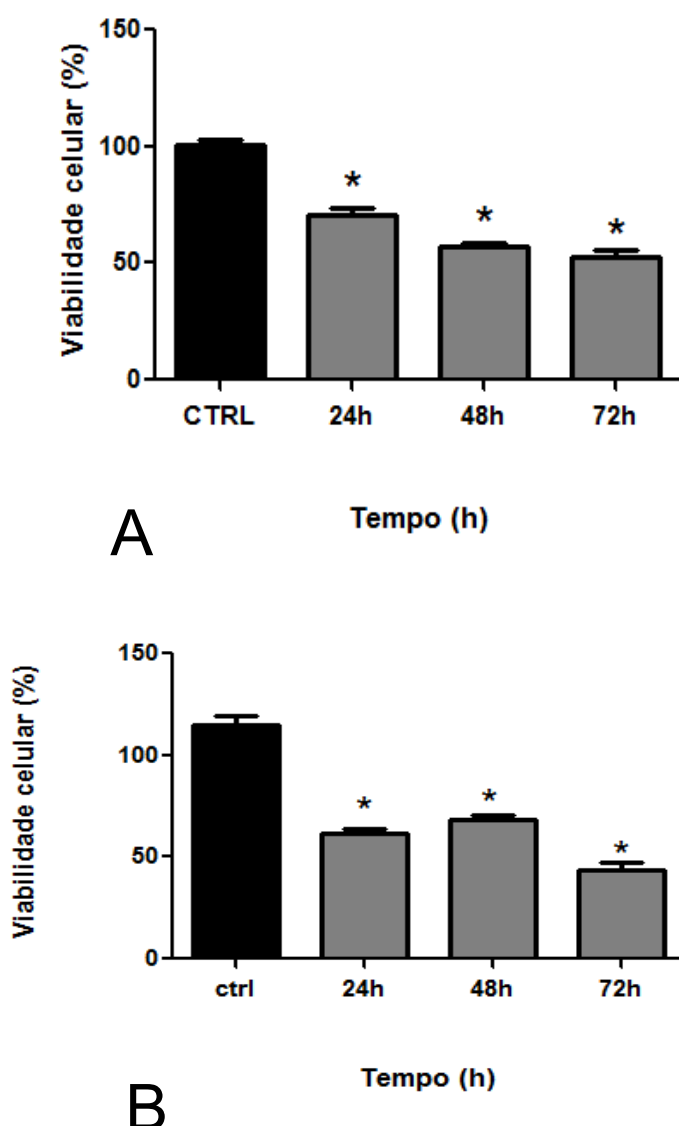


FIGURA 10: Efeito da fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* sobre células Calu-3 em diferentes períodos de tratamento. A viabilidade celular (%) foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT (A) e SRB(B), após o tratamento de 24, 48 e 72 horas de exposição ao óleo essencial na concentração de 1000 µg/mL. Os resultados são expressos com média e erro padrão da média, obtidos de no mínimo, três ensaios independentes, com o n=4 por ensaio. Os símbolos* representa diferença significativa obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ($p < 0,05$).

O óleo essencial de *J. officinale* na concentração de 1000 µg/mL gerou redução significativa da viabilidade celular de 30%, a partir do tempo de exposição de 24 horas. Para os tempos de exposição de 48 e 72 horas, observou-se uma redução da viabilidade celular, respectivamente, de 43% e 48%. Apesar da citotoxicidade do óleo essencial sobre a linhagem tumoral Calu-3 ser significativa em relação ao controle, essa não pode ser classificada como tempo dependente, pois não existe diferença significativa entre os tempos.

Resultados similares foram observados no ensaio da SRB corroborando o ensaio de redução de MTT. No tempo de exposição de 24 horas foi observada uma redução significativa da viabilidade celular de 39%. E respectivamente de 32% e 57% para os tempos de 48h e 72h.

Seal e colaboradores (2012), reportaram que a vaporização de óleos essenciais induz a morte de células tumorais em cultura, sendo seu estudo um dos primeiros a relatar o efeito antitumoral da fase vapor de óleos essenciais (óleo essencial de semente de *Litsea cubeba*) em células de pulmão A549. Neste sentido, diferentes óleos essenciais poderiam apresentar esta propriedade, incluindo a fase vapor do óleo essencial de *J. officinale*.

Quanto ao efeito antitumoral do óleo essencial de *J. officinale*, os relatos na literatura são escassos e insipiente, o trabalho de Kalaiselvi e colaboradores (2012) destaca-se como referência, os autores estudaram *in vivo* e *in vitro* os efeitos do gênero *Jasminum sambac* sobre o linfoma de camundongo. Existem relatos de que *Jasminum dispersum* e *Jasminum officinale* apresentem atividade antitumoral para carcinoma de nasofaringe de humanos (DHAWAN, 1980), todavia não encontramos relatos do efeito da fase vapor deste óleo essencial em células tumorais.

Apresentado o mesmo perfil de resposta encontrado por Seal e colaboradores (2012), o vapor do óleo essencial de *J. officinale* reduziu a viabilidade celular (Calu-3 e 3T3) de maneira dose-dependente, mas não tempo-dependente, com efeitos similares nos períodos de tratamento de 24 a 72 horas. O vapor do óleo essencial de jasmim apresentou efeito citotóxico em concentrações menores do que aquelas utilizadas por Seal e colaboradores (2012).

Com relação ainda aos efeitos da fase vapor dos óleos essenciais sobre células de câncer de pulmão, com base em resultados não publicados do grupo, foi verificado no trabalho de Justus (2015) que o vapor do óleo essencial de *Lavandula dentata* L. promoveu a redução na viabilidade celular de Calu-3 de maneira dose dependente com IC₅₀ estimando de 750 µg/mL, gerando parada de ciclo celular na fase G0/G1 e indução de morte celular por necrose. Em 2016, Tozetto avaliou o efeito da fase vapor do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L sobre a linhagem Calu-3, e obtendo um IC₅₀ 260 µg/mL e Maeda (2016)

utilizando o vapor do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth encontrou para células Calu-3 um IC₅₀ de 225 µg/mL. Com IC₅₀ de 1495,57 µg/mL o vapor de óleo essencial de *J. officinale* apresenta potencial uso como antitumoral, todavia não seria o melhor, quando comparado aos óleos essenciais de *P. cablin*, *T. vulgaris* e *L. dentata*. Porém o IC₅₀ da fase vapor de óleo essencial de *J. officinale* para células tumorais Calu-3 foi inferior ao IC₅₀ para células de fibroblastos normais 3T3 calculado em 3795,05 µg/mL

5.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA CELULAR DE CALU-3 TRATADAS COM A FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Jasimunum officinale* POR MEIO DO EMPREGO DOS CORANTES ALARANJADO DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDIO (AO/BE).

As células após o tratamento de 24 horas com o óleo essencial de *J. officinale* na concentração de 1000 µg/mL foram coradas com AO e BE e observadas por microscopia óptica de fluorescência. O efeito citotóxico referente ao mecanismo de ação da fase vapor do óleo essencial pode ser observado na Figura 11.

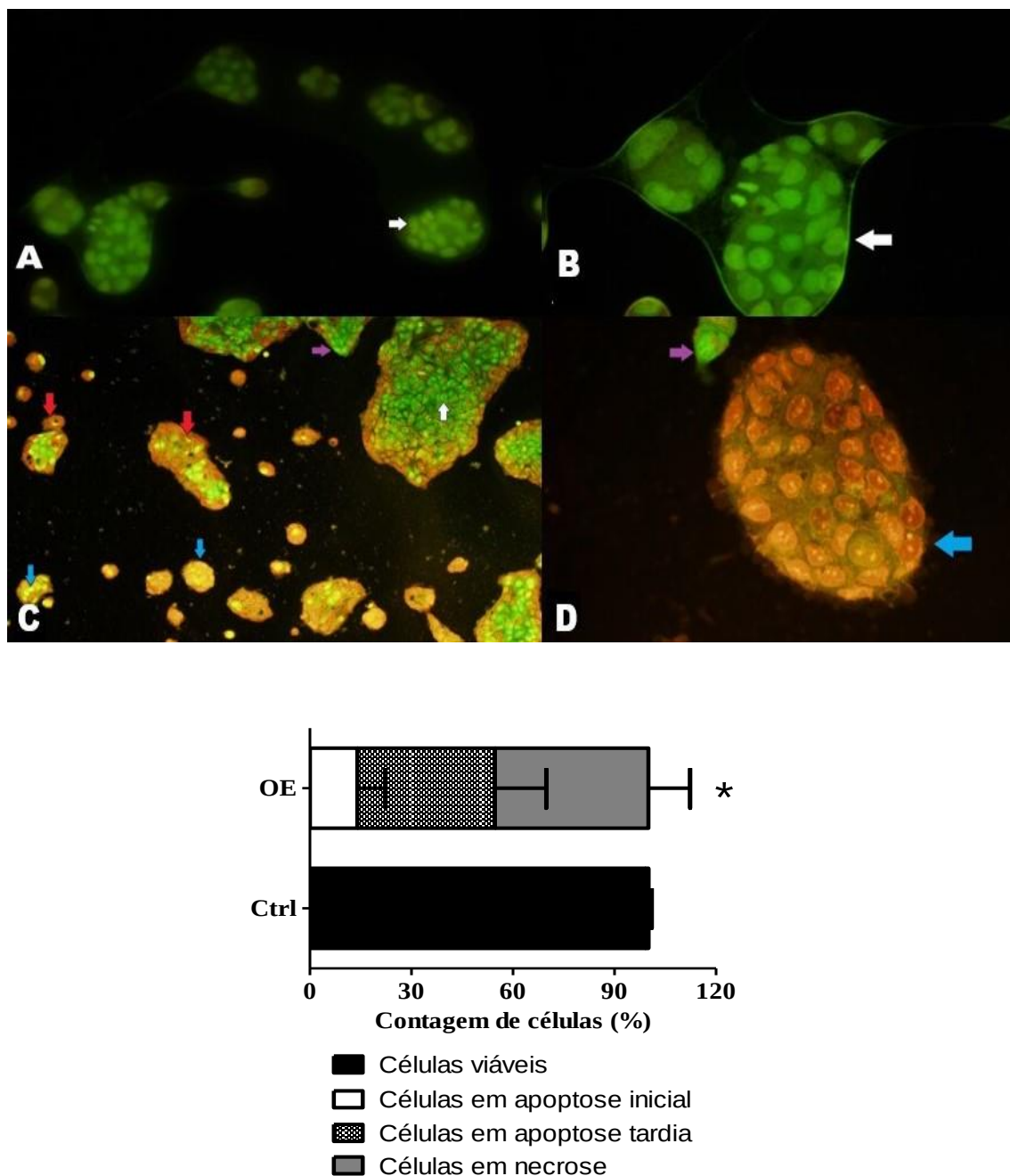


FIGURA 11: Efeito da fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* sobre a morfologia das células Calu-3 coradas com alaranjado de acridina e brometo de etídio. O controle está demonstrado em (A) e em (C), células tratadas em (B) e em (D) por 24 horas com o óleo essencial de *J. officinale* na concentração de 1000 µg/mL. As setas de cor azul indicam células em apoptose tardia, as setas rosas indicam células em apoptose inicial, as setas de cor vermelha indicam células em necrose, as setas brancas indicam células viáveis. (Microscopia óptica de fluorescência – aumento 200X em A e em C e 400X em B e em D). Abaixo verificamos a quantificação das células viáveis, apoptóticas (iniciais e tardias) e necróticas foi realizada pela contagem celular total das imagens em aumento de 200x. Os resultados foram apresentados em porcentagem. O símbolo * representa diferença significativa obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ($p < 0,05$).

Segundo Ribble e colaboradores (2005) a condensação da cromatina e fragmentação nuclear são as principais características de células em apoptose. Segundo os autores com o ensaio de AO/BE o índice apoptótico e a integridade da membrana celular podem ser avaliados ao mesmo tempo. Em células normais AO permeia todas as células e faz com que os núcleos apareçam em verde. O BE é permeável a membrana celular quando as células perderam a integridade e, portanto cora o núcleo de vermelho. Assim, as células vivas têm um núcleo verde normal; células nos primeiros estágios apoptóticos têm núcleo verde-claro com cromatina condensada ou fragmentada; células apoptóticas tardias exibem cromatina condensada e fragmentada na coloração laranja; células que morreram de necrose direta apresentam um núcleo laranja estruturalmente normal.

Na Figura 11 aumentos de 200 e 400X, observamos em (A) e em (B) células viáveis com coloração verde e núcleos normais, que apresentam cromatina com estruturas organizadas; em (C) e em (D) observamos a presença de células de coloração laranja, com núcleos disformes e brilhantes que demonstram condensação de cromatina, indícios de morte por apoptose tardia.

Conforme observado na Figura 11 o tratamento das células Calu3 com a fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* induz morte celular por apoptose, observadas tanto em fase inicial quanto tardia, e por necrose com as respectivas porcentagens de distribuição na contagem total, 14%, 40,67% e 45,33%.

Quanto à indução de necrose, existem relatos que óleos voláteis pode também induzir morte celular por necrose. De fato, Greay e colaboradores (2010) quando estudaram o efeito citotóxico do óleo de *Melaleuca alternifolia* (chá verde) em células de melanoma (Ae17) e (B16F10), verificaram que tanto o óleo quanto o composto majoritário terpinen-4-ol induziram parada do ciclo celular com indução de morte celular por necrose primária.

Cumprе ressaltar que dentre os mecanismos pelos quais a MDR conferem resistência aos tumores, o aumento de resistência à indução da apoptose é mencionado (BAGULEY, 2010), fato que talvez justifique a presença dos dois mecanismo de morte (apoptose e necrose), como resultado do tratamento de células Calu-3 com o vapor do OE de *J.officinale*.

5.4. ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE CALU-3 TRATADAS COM A FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Jasminum officinale* POR EMPREGO DA CITOMETRIA DE FLUXO

Foi avaliado também se a fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* poderia alterar a progressão e distribuição das células no ciclo celular, o que poderia explicar a redução da proliferação das células Calu-3, refletida pela menor redução de MTT e marcação por SRB. Para tanto, utilizou-se citometria de fluxo com o emprego do fluoróforo iodeto de propídio. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3. Distribuição porcentual das células Calu-3 tratadas com óleo essencial de *J. officinale* nas fases do ciclo celular

Distribuição das fases no ciclo celular				
Tratamento	Sub G0	G0/G1	S	G2/M
Controle	2,99 ± 0,46 _a	48,24 ± 2,80	20,85 ± 0,86	20,35 ± 0,88 _a
OE 1000µg/mL	1,99 ± 0,19 _b	56,9 ± 3,67	17,40 ± 1,60	17,76 ± 0,89 _b

As células Calu-3 foram tratadas com o óleo essencial de *J. officinale* na concentração de 1000 µg/mL pelo período de 24 horas. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da média (n=14-17). Letras diferentes representam diferença significativa evidenciada pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Células Calu-3 tratadas com o óleo essencial de *J. Officinale* na concentração de 1000 µg/mL apresentaram-se em menor percentual nas fases subG0 e G2M do ciclo celular, com diferenças estatísticas quando comparadas com as células sem tratamento (controle). Observou-se aumento da porcentagem de células na fase G0/G1, porém sem diferença estatística.

Na Figura 12 está ilustrada uma representação dos histogramas obtidos nos experimentos.

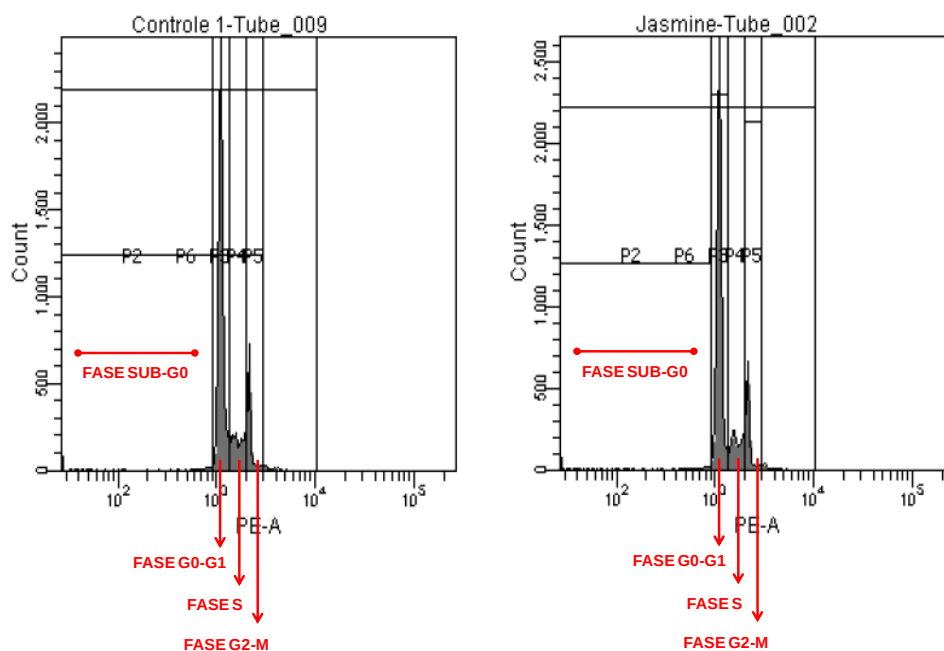


FIGURA 12: Histogramas de distribuição das células Calu-3 tratadas e não tratadas com óleo essencial de *J. officinale* nas diferentes fases do ciclo celular. Esta figura mostra histogramas representativos dos resultados de análise de ciclo celular por citometria de fluxo, (n=14-17). Nos histogramas observam-se células nas fases sub-G0, G0-G1, S e G2-M de onde foi retirado os valores em porcentagem expressos na Tabela 1.

Cabe comentar que o fluoróforo iodeto de propídeo (PI) intercala-se com o DNA das células e considerando-se uma população normal de células em proliferação, grande parte dessas contém quantidade de DNA correspondente a um número $2n$ de cromossomo (46 para humanos) correspondente a fase G0-G1 do ciclo celular), conforme indicada no histograma. Estas populações estão representadas no histograma na abcissa (fluorescência) com seu pico próximo a 10^3 . Entre estes picos estão às células que estão duplicando seu DNA (fase S) e a população de células à esquerda de G0-G1 apresenta, que apresenta DNA fragmentado, pois contém menos de $2n$ cromossomos, sendo denominada de sub-G0.

Em se tratando de efeito da fase vapor de OE e mecanismos envolvidos, Seal *et al.* (2012) relataram que o óleo essencial de sementes de *Litsea cubeba* em células de carcinoma de células não-pequenas (A549) gerou morte celular por indução de apoptose e causou parada de ciclo celular. O vapor gerado a partir dos óleos desativa Akt, uma proteína-chave para a proliferação e

crescimento de células cancerosas. Os autores comentam que o vapor do óleo essencial desfosforilou a Akt tanto em Ser473 como em Thr308, através da supressão de MTOR e pPDK1, respectivamente. Como consequência disso, ocorreu diminuição da fosforilação de Bad e diminuiu a expressão de Bcl-xL, que subsequentemente aumentou os níveis de Bax permitindo a liberação de citocromo c mitocondrial para o citosol com concomitantemente ativação da caspase 9 e da caspase 3 resultando na morte celular por apoptose. A desativação de Akt conduz a desativação de Mdm2 que atua sobre a expressão de p53 (proteína supressora de tumor) que, por sua vez regula positivamente a expressão de p21. Uma ligação de p21 aumentada à ciclina D1 interrompe a progressão de fase G1 para S do ciclo celular, efeito não observado neste trabalho (Tabela 3).

De fato as células Calu-3 tratadas com o óleo essencial de *J.officinale* na concentração de 1000 µg/mL apresentaram-se em menor percentual nas fases sub-G0 e G2-M do ciclo celular, apesar de ter sido observado aumento da porcentagem de células na fase G0-G1 importante, mas não significativo.

5.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA P - ENSAIO DE ACÚMULO DE RODAMINA 123

A atividade da glicoproteína P, uma proteína que gera resistência a fármacos nos tumores, pode ser determinada pelo acúmulo de rodamina 123 intracelular. Como pode ser observado na Figura 13, a curcumina, conhecida como inibidor da glicoproteína P, gera um acúmulo maior de rodamina intracelular significativo em relação ao controle. óleo essencial de *J. officinale* também promove um acúmulo de rodamina, todavia menor que o gerado pela curcumina, porém não significativo em relação ao controle. No entanto o óleo essencial pode agir em sinergismo com a curcumina e promover inibição da glicoproteína-P de maneira significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, ao controle com curcumina e apenas ao óleo essencial. Observado pelo acúmulo de rodamina aumentado de cerca de 150%.

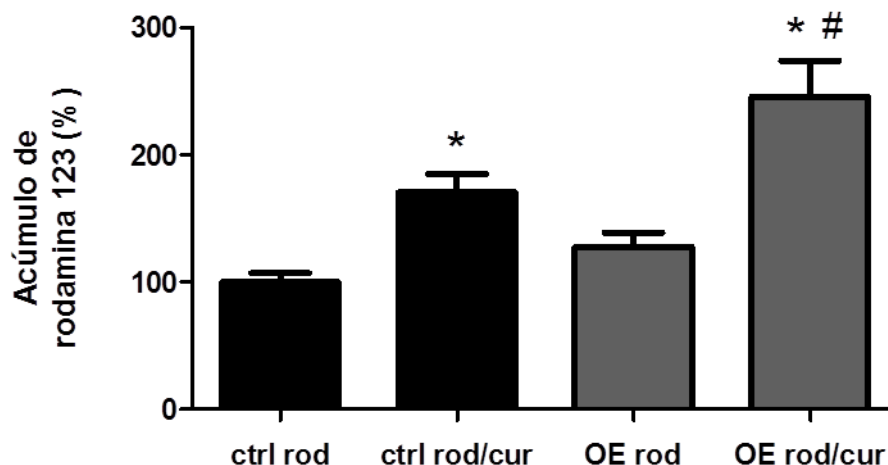


FIGURA 13: Acúmulo de Rodamina 123 em células Calu-3 tratadas com óleo essencial de *J. officinale* na concentração de 1000 µg/mL pelo período de 24 horas. As células após o período de tratamento foram expostas a rodamina 123 (5,25 µM) na presença e ausência de curcumina (10 µM). A fluorescência, referente ao acúmulo de rodamina intracelular foi quantificada por espectrofluorimetria e os dados foram expressos como média e erro padrão da média, obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes. * Diferença significativa obtida por análise de ANOVA uma via, seguida pelo teste POST-HOC de TUKEY ($p < 0,05$).

De fato, em relação ao tratamento do câncer, duas características são relevantes para efetividade de um fármaco: primeiramente este deve ser altamente seletivo em relação células cancerosas e ineficazes em relação às células normais e devem possuir a capacidade de agir contra células resistentes aos fármacos (COHEN e FLESCHER, 2009). O óleo essencial de *J.officinale* utilizado neste trabalho foi 2,54 vezes mais citotóxico para as células Calu-3 (IC_{50} 1495,57 µg/mL) quando comparado com as células 3T3 (IC_{50} 3795,05 µg/mL) e ainda óleo essencial de *J.officinale* também promove um acúmulo de rodamina, todavia menor que o gerado pela curcumina (controle positivo para inibição da glicoproteína P), porém não significativo em relação ao controle.

Cumprе ressaltar que insucesso da quimioterapia no tratamento do câncer resulta do desenvolvimento do fenômeno de resistência aos fármacos utilizados, não havendo resposta ao tratamento, por parte das células tumorais.

Segundo Huber e colaboradores (2010), os principais fatores envolvidos no fenômeno são o transporte da droga através da membrana plasmática, alteração nas enzimas-alvo, alteração no metabolismo da droga, aumento na reparação do DNA e incapacidade celular para sofrer apoptose. Dentre estes, o

primeiro é a principal forma de resistência está relacionada com a presença de, no mínimo, três bombas que transportam ativamente o quimioterápico para fora da célula (bombas de efluxo), proteínas pertencentes à superfamília ABC (ATP-binding cassette). Em células humanas, o gene denominado MDR1 está envolvido com o fenômeno de resistência múltipla a drogas, cujo resultado da expressão é um tipo específico de glicoproteína, a glicoproteína-P (P-gp).

Assim a busca por fármacos efetivos e atóxicos capazes de modular a resistência tem se acentuado. Tais fármacos são chamados de reversores, moduladores da MDR ou, ainda, quimiossensibilizadores. De maneira simples pode-se definir como quimiossensibilizadores os fármacos que se caracterizam por apresentar maior afinidade pela glicoproteína P, por conseguinte eles são retirados do interior das células enquanto os quimioterápicos permanecem.

Em relação ao emprego do α -hexilcinamaldeído no câncer, o composto foi utilizado no estudo de Giacomo e colaboradores (2016) com o objetivo de avaliar a sua capacidade de atuar como quimiossensibilizador. Os pesquisadores determinaram a toxicidade do α -hexilcinamaldeído em células tumorais humanas Caco-2, CCRF/CEM e CEM/ADR5000. Além disso, investigaram a capacidade do composto aumentar a citotoxicidade da doxorrubicina e através do ensaio de acúmulo rodamina123 evidenciar a possível interferência deste na atividade da glicoproteína P. Apesar da baixa citotoxicidade para as linhagens celulares o α -hexilcinamaldeído aumentou a citotoxicidade da doxorrubicina, sendo particularmente eficazes em CCRF/CEM. O composto também reduziu o efluxo da rodamina123 em células Caco-2 e CEM / ADR5000, sugerindo uma possível inibição da glicoproteína P.

Futuras pesquisas com a fase vapor do óleo essencial de *J.officinale* como um adjuvante ao tratamento de câncer de pulmão precisam ser realizadas elucidar o mecanismo relacionado a citotoxicidade, assim como Seal e colaboradores (2012) o fizeram. Cabe mencionar que como não existem padrões estabelecidos para a grande maioria dos óleos essenciais comerciais disponíveis, se faz necessário estabelecer a composição/identidade e pureza do óleo essencial para garantir a qualidade e a sua efetiva aplicação. Ainda se fazem necessários ensaios *in vivo* destinados a utilizar o vapor do óleo essencial de *J. officinale* em modelos animais de câncer de pulmão, para assim respaldar

a busca e o desenvolvimento de um instrumento clínico para a terapia do câncer de pulmão.

6. CONCLUSÃO

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

- A fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* é citotóxico de maneira dose, mas não tempo-dependente para células Calu-3 e 3T3;
- IC50 correspondente ao vapor do óleo essencial de *J. officinale* estimada para células Calu 3 foi de 1495,57 µg/mL e para células 3T3 de 3795,05 µg/mL.
- Composição química do óleo essencial de *J. officinale* compreende acetato de benzila com 31,43%, jasmonal (α -hexilcinamaldeído) com 30,49%, α -toluenol com 8,91%, linalol com 8,63%, antranilato de linalila 3,37%, benzoato de benzila 2,55%, α -terpineol 1,96%, salvanol 1,96%, benzil carbinol 1,88%, nerolin 1,00%, γ -terpineol 0,39% e acetofenona com 0,37%.
- Os possíveis efeitos associados à citotoxicidade da fase vapor do óleo essencial de *J. officinale* em células Calu-3 foram: (1) indução morte celular por apoptose, observadas tanto em fase inicial quanto tardia, e por necrose, com as respectivas porcentagens 14%, 40,67% e 45,33% e (2) interferência no ciclo celular devido menor percentual de células G2-M do ciclo celular e, apesar de não significativo, aumento da porcentagem de células na fase G0-G1.
- O vapor do óleo essencial de *J. officinale* promove um acúmulo de rodamina 123, por conseguinte gera inibição da atividade a glicoproteína P em sinergismo com a curcumina, sabidamente inibidor desta proteína.

REFERÊNCIAS

ALISON, M. R, Cancer. **Encyclopedia of life science**. Imperial College School of Medicine. London-UK, 2011.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com oDNA: uma introdução. Belo Horizonte-MG. **Química Nova**. v. 28, n. 01, p.118-129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). Cancer Facts and Figures 2013. Disponível

em:<[http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/docu ments/docu ment/acspc-036845.pdf](http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/docu ment/acspc-036845.pdf)>. Acesso em: 15 set. 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. How many people get lung cancer?, 2013. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-smallcell/overviewguide/lung-cancer-smallcell-overview-key-statistics>>. Acesso em: Setembro de 2016.

BAGULEY B. C. Multiple Drug Resistance Mechanisms in **Cancer Mol Biotechnol**, 46:308–316, 2010.

BARROS, F. E. V. Avaliação do ciclo celular de células hematopoiéticas da medula óssea de camundongos submetidos á desnutrição proteica. 135 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Farmácia) – Universidade de São Paulo – SP, 2007.

BERA, P.; MUKHERJEE, C.; MITRA, A. Enzymatic production and emission of floral scent volatiles in *Jasminum sambac*. **Plant Science**. 256, 25–38, 2017.

BERNARDI, A.; SILVA, M. C. J.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos antitumorais. **Infarma**. v. 15, n 9-10, p. 61-63. Set/Out, 2003.

BRANDÃO, N. H.; DAVID J. P.; COUTO R.D.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, p.1359-1369, 2010.

BRASIL. CENTRO DE RECURSOS BIOLÓGICOS. (Org.). Banco de células do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <HTTP://bcrj.org.br/>>. Acesso em 11 fev, 2016.

BRASIL. Portal Brasil. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/@@busca?SearchableText=estimativa+cancer>>. Acesso em: 20 fev, 2017.

BERDOWSKA, I. et al. Cytotoxic impact of phenolics from Lamiacea species on human breast cancer cells. **Food Chemistry**, v. 141, p.1313-1321, 2013.

BRILLAULT, J.; DE CASTRO, W.V.; COUET, W. Relative contributions of active mediated transport and passive diffusion of fluoroquinolones with various

lipophilicities in a Calu-3 lung epithelial cell model. **Antimicrobiol Agents Chemother**, v.54, p. 543–545, 2010.

CANDRASARI et al. O efeito de α -terpineol no ciclo celular, apoptose e Bcl expressão da proteína familiar da linha celular de câncer de mama MCF-7. **Journal Medical Science**, v 47, n 2, junho: 59-67, 2012.

CHANG MY, SHEN YL. Linalool exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity. **Molecules**, 19:6694–6706, 2014.

CHERNG JM, SHIEH DE, CHIANG W, CHANG MY, CHIANG LC. Chemopreventive effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, 71:1500–1504, 2007.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Análise Instrumental. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2000.

COHEN, S.; FLESCHER, E. Methyl jasmonate: Uma hormona de estresse de planta como um medicamento anticancerígeno. **Phytochemistry**, 70, 1600-1609, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 47-58. 2010.

CRISMAN, H.A.; STEINKAMP J. A. Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. **Journal Cell Biology**, v.59 (3), p. 766-771, 1973.

DEMOLE, E., LEDERER, E.; MERCIER, D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. **Helvetica Chimica Acta**, 1962.

DI SOTTO A.; MAFFEI F.B.; HRELIA P.C.; GIACOMO S.A.; PAGANO E.D.; BORRELLI F.D.; MAZZANT G.I. Genotoxicity assessment of some cosmetic and food additives. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 68, 16–22, 2014.

DHAWAN, B. N. Screening of Indian Plants for biological activity. Part IX, **Indian Journal of Experimental Biology**, v.18, p. 231-237, 1980.

FATOUMA, A.L. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and methanol extract of *Jasminum officinale* from Djibouti. **African Journal of Plant Science**, v.4 (3), p. 038-043, 2010.

FLESCHER, E. Jasmonates- Uma nova família de agentes ant-câncer. **Anticancer Drugs**, 16, 911-916, 2005.

FLESCHER, E. Jasmonates na terapia do câncer. **Câncer Lett**, 245,1-10, 2007.

FINGRUT, O.; FLESCHER, E. Planta de hormônios do estresse suprimir a proliferação e induzir a apoptose em células cancerosas humanas. **Leukemia**, 16, 608-616, 2002.

FINGRUT, O.; REISCHER, D., ROTEM, R., GOLDIN, N., ALTBOUM, I., ZAMBAR, I., FLESCHER, E. Jasmonetes induzir a morte nanopoptotic in- alta resistência mutante p53 expressando células de linfoma-B. Br. **Journal Pharmacol**, 146-800, 2005.

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

GIACOMO S.D.; MAZZANTI G.; SARPIETRO M.G.; SOTTO A. α -Hexylcinnamaldehyde Inhibits the Genotoxicity of Environmental pollutants in the Bacterial Reverse Mutation Assay. **Journal Nature**, 77, 2664–2670, 2014.

GIACOMO S.D.; SOTTO A.; ZAKI M.; MAZZANT G. α -Hexylcinnamaldehyde synergistically increases doxorubicin cytotoxicity towards human cancer cell lines. **Anticancer Research**, 36: 3347-3352, 2016.

GOMES, J. P. M. Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais. 86. Dissertação-Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Faculdade de ciências farmacêuticas. Araraquara, 2008.

GORMAN, A. M. Application of a fluorometric assay to detect caspase activity in thymus tissue undergoing apoptosis in vivo. **Journal of Immunological Methods**, v. 226, n. 1-2, p. 43-48, 1999.

GREAY S. J., D. J. IRELAND, H. T. KISSICK ET AL. “Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol”. Câncer. **Chemotherapy and Pharmacology**, vol.65, no. 5, pp. 877–888, 2010.

GU Y, TING Z, QIU X, ZHANG X, GAN X, FANG Y, XU X, XU R. Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors. **Toxicology**. 268:19–24, 2010.

HADFIELD. N. Therole of aromatherapy massage in reducing anxiety in patients with malignant braintumours”**International journal of palliative nursing**, v.7 (6), p. 279–285, 2001.

HAMILTON, O.; BACKSTROM, G.; YAZDANIAN, M.A.; et al. P-Glycoprotein effux pump expression and activity in Calu-3 cells. **Journal Pharmochol Science**, v.90, p. 647- 658, 2001.

HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of câncer.cell.; **100**, (1): 57-70. 2000.

HANAUSKE, A. R. et al. In vitro chemosensitivity of freshly explanted tumor cells to pemetrexed is correlated with target gene expression. **Invest New Drugs**, v.25, n. 5, p. 23417, 2007.

HART, N.; JOHNS S.; LAMBERTON J. A new monoterpenoid alkaloid from *Jasminum* species and from *Ligustrum novo guineense* (family Oleaceae). **Australian Journal of Chemistry**, v.21(5), p.1321-1326, 1967.

HASSAN SB, GALIB-MUHTASIB H, GORANSSON H, LARSSON R. Alpha terpineol: um potencial Agente anticancerígeno que atua Suprimindo a sinalização NF kB. **Anticâncer**. Res 30: 1911-20, 2010.

HUANG, H. Zhuang Medical Science in China. Guangxi Minority Nationalities Press, **Nanning**, 2001.

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

HUO, L. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts from the stems of *Jasminum nervosum* Lour. **Grasas Y Aceites**, v. 62, p.149–154, 2011a.

HUO, L. Volatile constituents of the leaves and the stems of *Jasminum nervosum* Lour. Lishizheng. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.22, p. 2616–2618, 2011b.

INCA (Org.). Tipos de câncer: pulmão. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>>. Acesso em: 1 jun. 2016.

INCA. Estimativa 2014- Incidência de câncer no Brasil. 1a edição. 2014.

INCA. Como é o processo de carcinogênese?. 1996. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>.

INCA. Hormonoterapia. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=103

INDRASETIWAN P, ASTUTI I, MUSTOFA. Atividade de α -terpineol como potencial Anticancer candidato: citotoxicidade, pro apoptotican da avaliação tiproliferativa em TD47 linhas de celular. **Journal Medical Science**; 44 (1): 10-, 2012.

IWASAKI, K; ZHENG, Y.W; OHKOHCHI, N. Efeito anticancerígeno do linalol através da geração de radicais hidroxílicos específicos de câncer de cólon humano. **Word Journal of Gastroenterologia**, 2016.

JENNINGS,M.W.; WILKINSON.M.; CAVANAGH, H.M. J., SHILLINGTON. Evaluating the effects of the essential oils *Leptospermum scoparium* (manuka) and *Kunzeae ricoides* (kanuka) on radiotherapy induced mucositis: a randomized, placebo controlled feasibility study. **European Journal of Oncology Nursing**, v.13 (2), p. 87–93, 2009.

JENSEN, S.R.; FRANZYK, H.; WALLANDER, E. Chemotaxonomy of the Oleaceae: Iridoids as taxonomic markers. **Phytochemistry**, v.60, p. 213–231, 2003.

JOUAN, E. et al. Evaluation of P-Glycoprotein Inhibitory Potential Using a Rhodamine 123 Accumulation Assay. **Pharmaceutics** 2016, 8, 12; doi: 10.3390/pharmaceutics80, 2012.

JUSTUS, Barbara. Morfoanatomia, análise química e atividades biológicas do óleo volátil de Lavândula dentada L.-Lamiacea. 2015, 85f. Dissertação 9 Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

KALAISELVI M. In vivo and in vitro antitumor activity of Jasminum sambac (Linn) Aitoleaceae flower against Dalton's ascites lymphoma induced swiss albino mice. **International Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v.4(1), p.144-147, 2012.

KANUNFRE, CARLA CRISTINE. Efeitos dos agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa e gama em células jurkat (linfócito t) e raji (linfócito b), 2003. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências Biológicas – Fisiologia Humana, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

KITE M.S. et al. "Development of an aromatherapy service at a cancer centre. **Palliative Medicine**, v.12 (3), p.171–180, 1998.

KRISHAN A. Rapid flow cytofluorometric analysis of cell cycle by propidium iodide staining. **Journal Cell Biology**, v. 66, p. 188-193,1975.

LAIRD, K.; PHILLIPS, C. Vapor phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p.169–174, 2011.

LE VEE, M.; JOUAN, E.; NOEL, G.; STIEGER, B.; FARDEL, O. Polarized location of slc and abc drug transporters in monolayer-cultured human hepatocytes. **Toxicol. In Vitro**, 2015.

M'BAREK A. et al. Cytotoxic effect of essential oil of thyme (Thymus broussonettii) on the IGROV1 tumor cells resistant to chemotherapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40 (11), p. 1537–1544, 2007.

MACHADO, B. F. M. T; FERNANDES JUNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v.3 (2), p. 105-127, 2011.

MAEDA L. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de Pogostemon cablin Benth em células de adenocarcinoma de pulmão (calu-3). Trabalho de conclusão de curso, UEPG, Ponta Grossa, 2016.

MILLER EC, MILLER JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis. **Câncer**.; 1: 1055-1064, 1981.

MITLER, R., LAM, E., Patógenos induzida programado morte celular em plantas superiores. **Trends in Microbiology** 4, 10-15, 1996.

MONTANARI, A. C; BOLZANI,V. S., Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Química Nova, vol.24 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2001.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

NAMKOONG, G. Decision making strategies for conservation and use of forest genetic resources. In: Internacional conference of science and technology for managing plant genetic diversity in the 21 century, 2000, Rome. Paper Rome: **Palm Oil Resource Institute of Malaysia (PORIM)**: IPGRI, 16 p, 2000.

National Cancer Institute, "Aromatherapy and Essential Oils (PDQ)," <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/cam/aromatherapy/Healthprofessional>. 2015

NAVANESAN S.; WAHAB NA; MANICKAM S. ; SIM KS. Evaluation of selected biological capacities of *Baeckea frutescens*. **BMC Complement Altern Med**, Jun 17;15:186, 2015.

NCI - National Cancer Institute, "Cancer Topics: Environment," 2013, <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/environment/AllPages>

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

NOOTER K.; HERWEIJER H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. **British Journal of Cancer**, v. 63 (5), p. 663–669, 1991.

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

PATIL, K. J.; PATIL, V. A.; PATIL, S. V.; BHUKTAR, A. S. Comparative preliminary phytochemical studies of *Jasminum multiflorum* and *Jasminum officinale*. **DAMA International**, v.1(3), p. 43-45, 2012.

PERRY, M. E.; LEVINE, A. J. The cell cycle. In Levine AJ, Schmelk HM (Eds) *Molecular genetics of Nervous System tumors*, 1 Ed. Wiley, Jhonsons, **Incorporated Hoboken**, pp 83-88, 1993.

PIKOR, L. A. et al. Genetic alterations defining SNCLC subtypes and their therapeutic implications. **Lung Cancer**, v.82, n. 2, p. 179-89, 2013.

PRAGADHEESH, V.S.; YADAV, A.; CHANOTIYA, C.S.; ROUT, P.K.; UNIYAL, G.C. Monitoring the emission of volatile organic compounds from flowers of *Jasminum sambac* using solid-phase micro-extraction fibers and gas chromatography with mass spectrometry detection. *Nat. Prod. Commun.* , v.6, 1333–1338, 2011.

RASUANE N, ASTUTI I, MUSTOFA. Citotoxicidade de A-terpineol na linha celular HeLa e seus efeitos para apoptose e ciclo celular. **Journal Medical Science**, 46 (1): 1-9, 2014.

REISCHER, D.; HEYFETS, A.; SHIMONY, S.; NORDENBERG, J.; KASHMAN, Y.; FLESCHER, E. Efeitos dos jasmonatos sintéticos naturais e inovadoras em experimento de melanoma metastásico. **Brazil Journal Pharmacol**, 150, 738-749, 2007.

RIBBLE, D. et al. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v.5, n.12, 2005.

RODRIGUES, F. S. S.; POLIDORI, M. M. Enfrentando a resiliência de pacientes em tratamento quimioterápico e seus familiares. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.58, n. 4, p 619-627, 2012.

RUSSO, R. et al. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

SABHARWAL, S.; SUDÃO. S.; RANJAN. V. Jasminum sanbac linn (motia): uma revisão. Departamento de farmácia. **Chandigarh grupo de faculdades**, Ladran, Mohali, 2013.

SARPIETRO M.G.; SOTTO A.; ACCOLLA M. L.; CASTELLI F. Interaction of α -Hexylcinnamaldehyde with a Biomembrane Model: A Possible MDR Reversal Mechanism. **Nature Produce**. 78 (5): 1154-1159, 2015.

SARASWATHY M.; GONG S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer, Department of Biomedical Engineering and Wisconsin **Institutes for Discovery**, University of Wisconsin-Madison, WI 53715, USA, 2013.

SARKADI, B. et al. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. **Physiological Reviews**, v.86 (4), p. 1179–1236, 2006.

SEAL S. et al.; Vapor of volatile oils from Litseacubeba seed induces apoptosis and causes cell cycle arrest in lung cancer cells. **PLoS One**, v.7, n 10, p.e47014, 2012.

SELVARINI, V. L.; JAMES, H. The activity of cedar leaf in oil vapor against respiratory viruses: practical application. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.3 (11), p. 011-01, 2013.

SILVA, A. C., Uma atualização sobre a influência das plantas medicinais em tratamento de quimioterapia. Dissertação (farmacologia aplicada) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2013.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. et al. farmacognosia da planta ao medicamento. 2. Ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Universidade Federal de Santa Catarina, p 394-412, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento, 5 ed. Porto Alegre: UFRGS/EDUFSC, 2005.

SODEN, K. et al. A randomized controlled trial of aromatherapy massage in a hospice setting. **Palliative Medicine**, v.18(2), p. 87–92, 2004.

SRITHAR G, SUDHA M, NALINI N. Linalool exerts dose dependent chemopreventive effect against 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon

carcinogenesis. **Internacional Journal Pharmacol Biological Arch**, 4:758–770, 2013.

STEINEGGER E.; HÄNSEL R. *Pharmakognosie*, 5th ed. Berlin: **Springer Verlag**, 1992.

SUFFENESS, M.; PEZZUTO, J. M. *Methods in Plant Biochemistry*. **Academic Press**, v.6 9pp. 71-134)., San Diego, 1991.

TANAHASHI, T. et al. Six secoiridoid glycosides from *Jasminum polyanthum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.45, p.367–372, 1997.

TAYARANI-NAJARAN, Z. et al. Antiemetic activity of volatile oil from *Menthaspicata* and *Menthapiperitain* chemotherapy-induced nausea and vomiting. **E câncer medical science**, v.7(1), article 290, 2013.

TODARO GJ, GREEN H . Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. **Journal Cell Biolical**, 17: 299-313, 1963.

TOZZETO L. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *thymus vulgaris* (tomilho) em células de adenocarcinoma de pulmão (calu-3). Trabalho de Iniciação científica, UEPG, Ponta Grossa, 2016.

TRAVIS, W. D. et al. International Association for the study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. **Journal Thorac Onco**, v. 6, n. 2, p. 244-85, 2011.

ULLAH M.F.M. Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 9 (1), 2008.

USTA J, KREYDIYYEH S, KNIO K, BARNABE P, BOU-MOUGHLABAY Y, DAGHER S. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. **Chem Biol Interact**, 180:39–46., 2009.

WALKER, S. Updates in non-small cell lung cancer. **Clinical Journal Oncol Nurse**, v.12, n. 4, p. 587-596, 2008.

WOLF, W.H.E.; RUND.C. Malignant cutaneous wounds: A management protocol. **Ostomy Wound Management**, v.43 (1), p. 56–66, 1997.

WOLFFWNBUTTEL, A. N. Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica. **Rocca**, São Paulo, 2010.

YE Q.; JIN X.; ZHU X.; LIN T.; HAO Z.; Yang Q. An Efficient Extraction Method for Fragrant Volatiles from *Jasminum sambac* (L.) Ait . **Journal of Oleo Science**, v. 64 , No. 6 p. 645-652, 2015.

ZHOU, B.B.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response in perspective, **Natures**, v.408, p. 433-9, 2000.

ZHU, Y.; CHIDEKEL, A.; SHAFFER, T. H. Cultured human airway epithelial cells (Calu-3): A model of human respiratory function, structure, and inflammatory responses. **Critical Care Research and Practice**, v.2010, p. 1-8, 2010.