

Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *eremanthus erythropappus* sobre células de câncer mamário MCF-7**Evaluation of the cytotoxicity of the essential oil of *eremanthus erythropappus* on breast cancer cells MCF-7**

DOI:10.34119/bjhrv3n3-062

Recebimento dos originais: 19/04/2020

Aceitação para publicação: 19/05/2020

Orlando Carvalho de Lima Filho

Biomédico pela Universidade Federal de Goiás-Regional Jataí
Instituição: Universidade Federal de Goiás-Regional Jataí
Endereço: Rodovia BR 364, km 195 Setor parque industrial n3800
Jatai-GO. CEP 75801-615
Campus jatobá-Cidade Universitária
E-mail: orlando-carvalho-@hotmail.com

Alessanie Ayumi Morita Gonçalves Pereira

Biomédica pela Universidade Federal de Goiás-Regional Jataí. Goiás, Brasil
Instituição: Universidade Federal de Goiás-Regional Jataí
Endereço: Rodovia BR 364, km 195 Setor parque industrial n3800
Jatai-GO. CEP 75801-615
Campus jatobá-Cidade Universitária
E-mail: ayumiimoritta@gmail.com

Claudinei Alves da Silva

Doutorado em Química (Química Analítica) pela Universidade de São Paulo, USP, São Paulo-SP, Brasil
Instituição: Universidade Federal de Goiás-Regional Jataí
Endereço: Rodovia BR 364, km 195 Setor parque industrial n3800
Jatai-GO. CEP 75801-615
Campus jatobá-Cidade Universitária
E-mail: clalvess@gmail.com

Adalberto Manoel da Silva

Doutorado em Química (Química Orgânica) pela Universidade de São Paulo, USP, São Paulo-SP, Brasil
Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense-Campus Araquari
Endereço: Rodovia BR 280 - km 27 - Cx. Postal 21 - CEP 89245-000 - Araquari - SC
E-mail: adalbert31@hotmail.com

Marize Campos Valadares

Doutorado em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
Campinas, São Paulo, Brasil.

Instituição: Universidade Federal de Goiás-UFG, Goiânia-Goiás, Brasil
Endereço: R. 240, S/n - Setor Leste Universitário, Goiânia - GO, 74605-170
E-mail: marizeufg@gmail.com

Alane Pereira Cortez

Doutorado em Parasitologia pela Universidade de São Paulo-USP, São Paulo-SP, Brasil.

Instituição: Universidade Federal de Goiás-UFG, Goiânia-Goiás, Brasil
Endereço: R. 240, S/n - Setor Leste Universitário, Goiânia - GO, 74605-170

Michelle Rocha Parise

Doutorado em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
Campinas, São Paulo, Brasil.

Instituição: Universidade Federal de Goiás-Regional Jataí
Endereço: Rodovia BR 364, km 195 Setor parque industrial n3800
Jatai-GO. CEP 75801-615
Campus jatobá-Cidade Universitária
E-mail: microcha123@ufg.br

RESUMO

O câncer é uma doença caracterizada por crescimento celular desordenado em decorrência de mutações genéticas e fatores ambientais, podendo acometer os mais variados tecidos e órgãos, além de se disseminar para tecidos distantes do foco inicial através da corrente sanguínea e de vasos linfáticos. O câncer de mama, classificado de acordo com as células acometidas em intraductal ou intralobular, representa 20% de todos os tipos de câncer existentes no mundo. Seu tratamento abrange várias abordagens terapêuticas, sendo que cada qual possui eficácia e efeitos colaterais particulares. Uma vez que o número de indivíduos acometidos todos os anos com essa doença aumenta e que a terapia pode falhar, a busca por novas terapias, mais eficazes e com menos efeitos colaterais, se justifica. Neste sentido, as células tumorais mamárias da linhagem celular MCF-7 são um modelo de grande importância para estudos de fármacos anticancerígenos em potencial. A planta *Eremanthus erythropappus* (EE), popularmente conhecida como Candeia, destaca-se pela produção do óleo essencial (OE) rico em alfa-bisabolol (α -B), esta última com propriedades antitumorais descritas na literatura. Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos citotóxicos *in vitro* do OE de EE rico em α -B sobre a linhagem celular MCF-7 visto que não há registros na literatura dos efeitos citotóxicos do referido OE sobre esta linhagem. Ademais, pode haver uma sinergia entre os demais constituintes do OE, o que pode potencializar o efeito antitumoral do α -B. Nossos achados demonstraram que os tipos celulares testados (células tumorais MCF-7 e fibroblastos 3T3) são sensíveis aos efeitos tóxicos do OE de EE e do α -B após 24h de exposição, e tal efeito mostrou-se concentração dependente. No entanto, apesar do OE de EE ter o α -B como principal constituinte, seu perfil de citotoxicidade difere em relação ao α -B isolado, sendo o α -B isolado capaz de exercer menor efeito citotóxico sobre os fibroblastos, característica desejável e que o OE de EE não apresentou. Sendo assim, o α -B é mais promissor agente antitumoral, apesar de serem necessários experimentos *in vivo* para determinar sua segurança e eficácia. No que diz respeito ao OE de EE, os demais constituintes do OE precisam ser avaliados

isoladamente ou de forma combinada com o α -B a fim de identificar qual(is) o(s) componente(s) responsável(eis) pela elevada citotoxicidade encontrada para fibroblastos 3T3.

Palavras-chave: citotoxicidade; Câncer de mama; MCF-7; *Eremanthus erythropappus*; óleo essencial; alfa-bisabolol.

ABSTRACT

Cancer is a disorder characterized by disordered cell growth due to genetic mutations and environmental factors, which can affect the most varied tissues and organs, as well as spread to distant tissues from the initial focus through the bloodstream and lymphatic vessels. Breast cancer, classified according to the cells involved either intraductal or intralobular, accounts for 20% of all cancers in the world. The treatment of breast cancer encompasses several therapeutic approaches, each of which has its efficacy and particular side effects. Since the number of individuals bearing this disease increases every year and the therapy may fail, the search for new, more effective therapies with fewer side effects is needed. In this sense, mammary tumor cells of the MCF-7 cell line are a model of great importance for studies of potential anticancer drugs. The plant *Eremanthus erythropappus* (EE), popularly known as Candeia, stands out for the production of essential oil (EO) rich in alpha-bisabolol (α -B), a substance with antitumor properties. Thus, the present study evaluated the *in vitro* cytotoxic effects of EE EO α -B rich on the MCF-7 cell line since there are no records in the literature of the cytotoxic effects of the referred EO on this lineage. In addition, it is possible that there is a synergy of the other constituents of EO, which may potentiate the antitumor effect of α -B. Our findings allowed us to conclude that the tested cell types (MCF-7 tumor cells and 3T3 fibroblasts) are sensitive to the toxic effects of EE and α -B OE after 24h exposure, and that effect has been shown to be a concentration dependent. However, although the EO of EE has the α -B as the main constituent, its cytotoxicity profile differs in relation to the isolated α -B, being isolated α -B capable of exerting a lower cytotoxic effect on the fibroblasts, a desirable characteristic and that EO of EE did not present. Thus, α -B is the most promising antitumor agent, although *in vivo* experiments are required to determine its safety and efficacy. With respect to EE, other EO constituents need to be assessed alone or in combination with α -B in order to identify which component (s) are responsible for the high cytotoxicity found for 3T3 fibroblasts.

Keywords: cytotoxicity; breast cancer; MCF-7; *Eremanthus erythropappus*; essential oil; alpha-bisabolol.

1 INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 CÂNCER

O câncer é uma doença caracterizada por crescimento celular desordenado, podendo acometer os mais variados tecidos e órgãos, além de se disseminar para tecidos distantes do foco inicial através da corrente sanguínea e de vasos linfáticos, neste último caso ocorrendo no estado inicial da disseminação metastática (BRASIL,2018; PRADO, 2014).

Tanto fatores ambientais como genéticos auxiliam no desenvolvimento do câncer, sendo que 80% estão relacionados com fatores ambientais, tais como alimentação, estilo de vida, exposição a agentes tóxicos (ALMEIDA et al., 2005; BRASIL, 2018). Outro fator é a produção de genes anormais durante a replicação ou a reparação, não se caracterizando como um fator hereditário (FETT-CONTE et al., 2000).

Esta doença é um problema de saúde pública, acometendo vários indivíduos todos os anos. Em 2030 estima-se 27 milhões de novos casos e 17 milhões de óbitos pelo câncer (BRASIL, 2018). Estes números vêm aumentando gradualmente no decorrer dos anos, formando assim uma curva ascendente no número de indivíduos acometidos pela doença. Para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022 estima-se ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (BRASIL, 2020).

Há mais de 100 tipos de câncer, classificados e nomeados de acordo a localização anatômica, e com a capacidade de invasão tecidual (BRASIL, 2016).

Dentre os diversos tipos de câncer, o de mama se destaca pela alta incidência em todo mundo, destacando-se como a principal causa de morte entre as mulheres em todo mundo. É uma doença heterogênea com diferentes subtipos moleculares associado com diferentes comportamentos clínicos e características morfológicas (SASCO, 2003; LOPES, 2015).

1.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres no mundo, representando 20% de todos os tipos de câncer, podendo ocorrer também em homens, sendo que neste caso menos de 1% são diagnosticados (INUMARU et al., 2011; BRASIL, 2016).

Em 2018 foram diagnosticados 2,1 milhões de indivíduos com câncer de mama em todo mundo. Para o Brasil, estimam-se 66.280 casos novos de câncer de mama, para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a um risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres. A alta incidência do câncer de mama no mundo ocorre em regiões desenvolvidas, entretanto, este cenário está mudando, visto que sua incidência está se elevando em quase todas as regiões. No entanto, indo na contramão desses índices, as taxas de mortalidade têm diminuído em regiões desenvolvidas, fruto de um diagnóstico precoce e consequente aumento das chances de cura (GILLILAND et al., 2000; WHO, 2016; BRASIL, 2020).

Nas mulheres, exceto o câncer de pele não melanoma, os cânceres de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) figurarão entre os principais. Este tipo de câncer (sem considerar os tumores de pele não melanoma) ocupa a primeira posição mais frequente em todas as regiões brasileiras, com um risco estimado de 81,06 por 100 mil na Região Sudeste; de 71,16 por 100 mil na Região Sul; de 45,24 por 100 mil na Região Centro-Oeste; de 44,29 por 100 mil na Região Nordeste; e de 21,34 por 100 mil na Região Norte (BRASIL, 2020).

O câncer de mama decorre de uma alteração no crescimento de células mamárias, pela modificação dos genes que irão regular o crescimento e a diferenciação celular (WCRF, 2007; INUMARU et al., 2011).

O carcinoma mamário pode ser classificado de acordo com as células acometidas, em intraductal ou intralobular. O carcinoma intraductal ou ductal *in situ* não é invasivo, isso porque não abrange tecidos adjacentes, acometendo assim somente os ductos mamários, porém, se não tratado, pode se tornar um câncer invasivo. O carcinoma infiltrante ou lobular *in situ* é invasivo e tem o seu início nas glândulas mamárias nos ductos lactíferos podendo ocorrer a ruptura da parede do ducto atingido do tecido adiposo contido na mama, e pode se disseminar para outras partes do corpo, correspondendo a 10% dos tipos de câncer de mama (ACS, 2016).

Assim como os demais tipos de câncer, o carcinoma mamário pode ocorrer devido a fatores ambientais como idade, alimentação e estilo de vida, os quais contribuem para o desenvolvimento da doença, além de fatores genéticos (INUMARU et al., 2011; BRASIL, 2016).

O desenvolvimento do câncer de mama está ligado também a fatores hereditários e adquiridos, onde alguns genes irão predispor o indivíduo ao desenvolvimento da doença, são eles: *HER2* (Fator do Crescimento Epidérmico 2), *BRCA*, *CHEK2* e *P53*. Tais genes irão contribuir para o desenvolvimento do tumor, por exemplo, em mulheres que possuem o gene *BRCA1* e *BCRA2* a chance de desenvolver o câncer de mama chega a 60%; já em homens que possuem o gene *BCRA2*, a chance é de 5 a 10% e nos que possuem o gene *BCRA1* a chance é de 1 a 2% (ROGERS & TIKKANEN, 2012).

Por apresentar característica heterogênea, o câncer de mama consiste em uma variedade de perfis moleculares como o câncer luminal, com expressão de citoqueratinas que possuem receptores de estrogênio; o HER-2 positivo, que não possui receptores para estrogênio; o HER-2 negativo, que expressa citoqueratina na camada basal epitelial; e o

câncer basal *like*, que possui receptores para estrogênio e progesterona (PEROU, 2000; BUITRAGO et al., 2011).

O câncer de mama pode apresentar sinais e sintomas que geralmente levam o paciente a procurar o serviço de saúde, são eles: a presença de um nódulo palpável com a presença ou não de dor, pode ocorrer também variações na coloração da pele, com aspecto de casca de laranja e secreções nos mamilos com o aparecimento de nódulos nas axilas (COWIE, 1991).

O diagnóstico, entretanto, na maioria das vezes é tardio, agravando o tratamento. Neste sentido, a falta de políticas públicas para com a doença é um dos fatores que eleva o número de óbito todos os anos (KOCK et al 2000; BUITRAGO et al., 2011; BRASIL, 2016).

O exame clínico tem um papel fundamental no diagnóstico, possibilitando um prognóstico precoce e rápido. A mamografia é uma das técnicas utilizadas no diagnóstico a qual, com o auxílio de um aparelho de raio-X conhecido como mamógrafo, irá comprimir a mama fornecendo assim imagens internas desta, sendo possível detectar se há ou não alguma alteração, porém esse método diagnóstico não é eficiente em tumores que apresentam tamanho inferior a 1 centímetro (BRASIL,2014; BRASIL, 2016).

A ultrassonografia é outra técnica utilizada no diagnóstico inicial do câncer de mama, entretanto, por não apresentar as microcalcificações, é utilizada apenas em pacientes que são assintomáticos, como no caso de mamografias negativas ou densas. A ressonância magnética também é utilizada no diagnóstico, sendo geralmente feita em mulheres que já possuam uma predisposição para o desenvolvimento de um carcinoma mamário (CRYSTAL, et al., 2003; URBAN et al., 2012).

Marcadores tumorais são também muito utilizados no diagnóstico de câncer. O organismo ou o próprio tumor produzem macromoléculas de proteínas ou fragmentos destas concentrando-se no sangue e em outros fluidos biológicos, o que facilita a sua detecção e seu diagnóstico. Para o diagnóstico do câncer de mama, são utilizados marcadores tais como o CA 15.3, CA 27,29, MCA, BTA e o CA 50 (CAPELOZZI, 2001; MATTOS et al.; 2005).

1.2.1 Tratamento

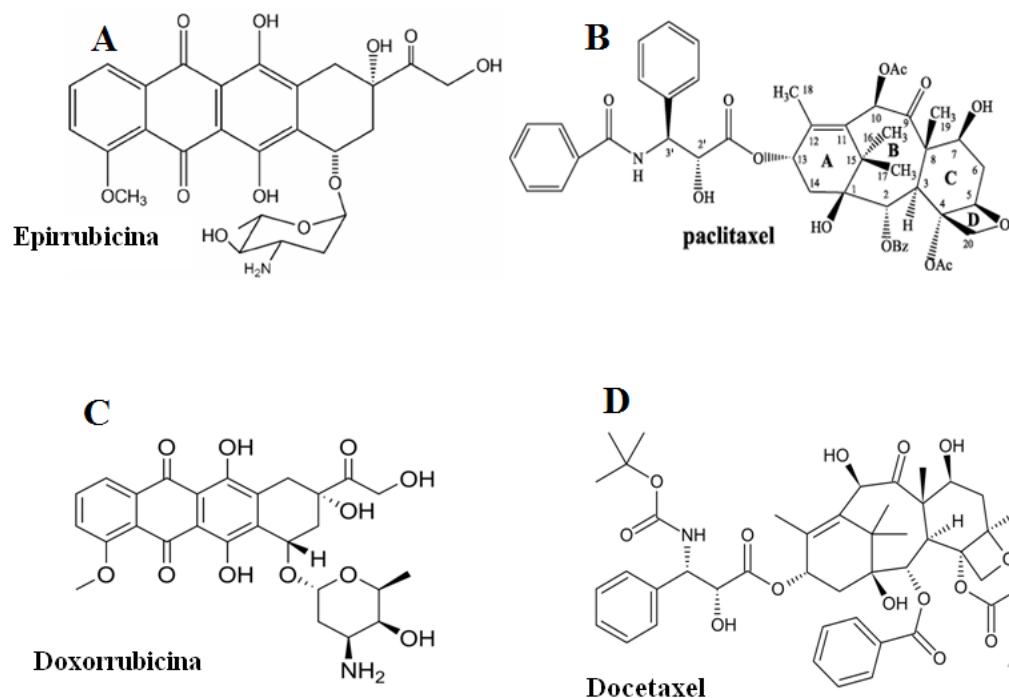
O tratamento do câncer de mama é baseado em exames histopatológicos, a fim de determinar o grau de acometimento da doença, e direcionando o paciente a um tratamento específico (SILVA & SANTOS, 2008; SILVA et al., 2010). Dependendo do estágio do

câncer, ele pode se apresentar como loco-regional ou sistêmico. Para o tratamento loco-regional é indicada a radioterapia e a cirurgia, já para o tratamento sistêmico, é utilizada a hormonioterapia e a a quimioterapia (BRASIL, 2020).

1.2.1.1. Quimioterapia

Quimioterápicos são agentes antineoplásicos utilizados no tratamento do câncer de mama, os quais agem combatendo as células tumorais e, conseqüentemente, auxiliando na inibição do crescimento do tumor. Há vários fármacos e combinações de fármacos disponíveis para o tratamento quimioterápico do câncer de mama, alguns destes irão compor um esquema padrão na terapia adjuvante e neoadjuvante, estabelecendo uma melhor eficácia clínica e diminuindo os casos de recorrência. Os principais agentes antineoplásicos utilizados (Figura 1) são as antraciclina (doxorrubicina e epirrubicina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel) (SERPE,2006; AHMAD, 2013).

Figura 1 – Estrutura química dos fármacos Antraciclina (doxorrubicina e epirrubicina) e Taxanos (paclitaxel e docetaxel)



Fonte: Adaptado de: A: Lewin (2014), B: Souza (2004), C: Almeida et al (2005), D: Souza (2004).

No entanto, os agentes antineoplásicos taxanos, paclitaxel (Taxol[®]) e docetaxel (Taxotere[®]), produzem efeitos adversos nos pacientes, como neutropenia, mucosite e

alopecia (MARTY et al., 1994; DONATI & CASTRO, 2011). Já as antraciclina doxorubicina (Adriamycin®) e epirrubicina (Elvence®) apresentam efeitos adversos como cardiomiopatia, insuficiência cardíaca e confusão mental (KOMEN, 2010; CAMPOS et al., 2011).

A quimioterapia pode ser utilizada em várias fases do tratamento do câncer de mama, antes da cirurgia e após a cirurgia. Quando realizada antes da cirurgia (quimioterapia neoadjuvante), tem por objetivo diminuir o diâmetro do tumor, sendo o mesmo removido com uma cirurgia menos extensa. Quando utilizada pós cirurgia (quimioterapia adjuvante) é feita com intuito de eliminar células cancerígenas remanescentes da cirurgia. Quando há um estado avançado da doença, com a proliferação do câncer para regiões fora da mama, a quimioterapia é a principal forma de tratamento (ACS, 2018).

Os quimioterápicos podem ser administrados por diversas vias, como a via intramuscular, oral, tópica, subcutânea, intratecal, dentre outras (AHMAD, 2013).

Apesar de ser amplamente utilizado, o tratamento com quimioterápicos muitas das vezes não é eficaz, pois o medicamento pode causar toxicidade ao organismo, visto que não possui seletividade para as células tumorais, ou induzir ao desenvolvimento de resistência (PIRANDA et al., 2013).

O tratamento do câncer de mama abrange várias abordagens terapêuticas, sendo que cada qual possui eficácia e efeitos colaterais particulares. Uma vez que o número de indivíduos acometidos todos os anos aumenta e que a terapia pode falhar, faz-se necessária a busca por novas terapias, mais eficazes e com menos efeitos colaterais.

Neste sentido, agentes quimioterápicos de origem vegetal que apresentem uma menor toxicidade e maior espectro de atividade antitumoral, são pesquisados.

1.3 *EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS*

Dentre as diversas plantas do gênero *Eremanthus*: *Eremanthus arboreus* (Gardner) MacLeish, *Eremanthus brasiliensis* (Gardner) MacLeish, *Eremanthus polycephalus* (DC.) MacLeish, *Eremanthus glomerulatus* Less., *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish, *Eremanthus incanus* (Less.) Less, entre outras, destaca-se a *Eremanthus erythropappus* Macleish juntamente com a *Eremanthus incanus* (Less.) Less como as de maior ocorrência no Brasil (SCOLFORO et al., 2002).

A planta *Eremanthus erythropappus* (D.C.) MacLeish (EE), também chamada *Vanillosmospis erythropappa* Schultz-Bip, família *Asteraceae*, é popularmente conhecida como "Candeia da Serra" (SCOLFORO et al., 2002)

Pertencente ao grupo ecológico das pioneiras, é considerada precursora na invasão de campos (CARVALHO, 1994). É uma espécie que compõe a vegetação de florestas nativas do território brasileiro, e possui elevado valor econômico (SCOLFORO et al., 2002).

O seu desenvolvimento ocorre em solo pouco fértil, geralmente em campos e, quanto à área de ocorrência, são encontradas na Argentina, Paraguai e Brasil (CARVALHO, 1994).

A EE está presente no Brasil predominantemente nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, mas nos estados de Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e, Distrito Federal, também pode ser encontrada (CARVALHO 1994).

Desenvolve-se rapidamente em campos de altitude variando entre 900 e 1.700 m, com solos pouco férteis e rasos. É uma árvore cuja altura varia de 2 a 12 m, podendo atingir 35 cm de diâmetro (SCOLFORO et al., 2002). O seu tronco possui uma casca grosseira e cheia de sulcos no caule, já nos galhos mais novos, a casca torna-se menos rústica. As folhas possuem uma dupla coloração, que é uma característica bem relevante; na parte superior, as folhas apresentam cores esverdeadas e são bastante lisas e na parte inferior possuem cor branca, sendo mais aveludadas. As flores são hermafroditas e apresentam coloração púrpura nas extremidades dos ramos (ARAÚJO, 1944).

Essa espécie é utilizada de diversas formas, incluindo o uso de sua madeira como mourão de cerca, devido a sua durabilidade e resistência, e também na produção de óleo essencial (OE) rico em alfa-bisabolol (α -B) (TEIXEIRA et al., 1996; SILVÉRIO, 2004).

OE é uma substância lipídica volátil conhecida por exalar um odor intenso, obtida de partes das plantas como galhos, madeira, folhas, entre outros. A extração do OE pode ser realizada por vários métodos como a maceração, enfleuragem, extração por solvente, micro-ondas e a hidrodestilação, que é a mais empregada (CRAVEIRO et al., 1981).

Estudos químicos realizados com a EE identificaram, além do α -B: costunolídeo, eremantina, ciclocostulídeo, vanilosmina, 15-desoxigoyazensolídeo e substâncias derivadas do ciclocostulídeo e da eremantina (VICHNEWSKI et al., 1976; LIMA et al., 2013). Outros sesquiterpenos também foram identificados na espécie (BRAUN et al., 2003).

Analisando o percentual dos constituintes do OE de EE, Silvério (2013) identificou apenas dois componentes, o β -elemeno (5,6%) e o α -B (93,1%). É importante ressaltar que neste estudo os 1,3% restantes não foram identificados. Por sua vez, Braun (2003) verificou

que o óleo extraído da madeira de EE contém aproximadamente 55,9% de α -B, além de 7,5% de oxido de bisabolol B, 4,8% de eremantina e 2,9% de 11 β ,13-dihydroeremantina.

Isto se explica pelo fato que fatores como parte da planta, luminosidade, disponibilidade de nutrientes, umidade, estação do ano, período do dia, ciclo, bem como fatores genéticos (PERRI et al., 1999; VESELA et al., 1999; ANDRADE & GOMES, 2000; SKOULA et al., 2000; VIEIRA et al., 2001; CARVALHO-FILHO et al., 2006) são capazes de alterar a biossíntese de substâncias naturais nos vegetais. Lopes e colaboradores (1991) demonstraram em seus estudos que pode ocorrer variação na composição química do OE da madeira de EE quando coletada em diferentes localidades levando em conta que durante a sua vida foliar, podem ocorrer alterações nos processos metabólicos da planta, ocasionando mudanças na composição química do OE das folhas (SOUSA et al., 2008). Logo, as variações do rendimento dependem intrinsecamente da procedência regional (MORI, 2008).

Independentemente da procedência, o óleo essencial extraído da Candeia possui o α -B como constituinte predominante e este possui diversas propriedades medicinais, incluindo propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antimicóticas, dermatológicas e espasmódicas, sendo comumente empregado na indústria de produtos cosméticos e dermatológicos. Na medicina popular é utilizada como cicatrizante, no tratamento de úlceras intestinais e no combate a infecções (SILVÉRIO, 2004; SOUSA et al., 2003; TEIXEIRA et al., 1996).

1.4 ALFA BISABOLOL

O α -B é um óleo lipofílico apresentando tendência à oxidação (óxido de bisabolol A e óxido de bisabolol B), tais óxidos possuem atividades biológicas contra edema e dor. Pode apresentar também atividade citotóxica. As primeiras células testadas com alfa bisabolol foram as de glioma, onde foi possível observar uma alta atividade concentração-dependente, gerando a morte celular das células em baixas concentrações. A atividade citotóxica foi observada em outros tipos de células tumorais, como no carcinoma do fígado, pulmão, pancreático e leucemia (TOMIC, et al, 2013).

O α -B tem afinidade pelos lipídeos encontrado em várias células, facilitando sua entrada dentro destas e conseqüentemente exerce atividade sobre a proteína p53 e o fator nuclear Kappa B (DARRA et al., 2008; SEKI et al., 2011).

Ainda não foi possível o desenvolvimento de um agente antitumoral que apresente seletividade para células tumorais, interferindo na viabilidade de células normais. Porém

estudos demonstram que o α -B pode induzir a apoptose em linhas tumorais do câncer pancreático, não atingindo as células normais (DARRA et al., 2008).

1.5 CÉLULAS MCF-7

A linhagem celular MCF-7 foi desenvolvida em Detroit (*Michigan Cancer Foundation*) no ano de 1970, pelo cientista Dr. Hebert Soule. Esta linhagem é composta por células de carcinoma mamário, sendo derivada de uma paciente de 69 anos apresentando câncer de mama com metástase para a pleura e parede torácica. O Dr. Soule obteve tais células a partir de uma excisão de um nódulo da parede torácica e de um derrame pleural (SOULE et al, 1973).

Naquela época, muitos laboratórios tinham documentado dificuldades técnicas na geração de culturas estáveis de linhagens celulares cancerígenas contínuas, como o crescimento excessivo de fibroblastos, e vários pesquisadores tinham tentado isolar linhagens de células usando diferentes substratos e nutrientes. O processo de desenvolvimento da linhagem celular que foi utilizada por Soule foi o padrão da época, e as culturas de células derivadas dos nódulos da parede torácica foram logo contaminadas por fibroblastos e então descartadas (SOULE et al, 1973).

No entanto, as células de derrame pleural cresceram inicialmente em suspensão e, em seguida, em última análise, formaram uma monocamada aderida em plástico que cresceu como uma cultura contínua. A linhagem de células resultante foi chamada de MCF-7, em homenagem a Fundação do Câncer em Michigan (*Michigan Cancer Foundation, MCF*), e foi a sétima tentativa de Soule na geração de uma linhagem de células cancerígenas, por isso utilizou o número 7 (LEE, et al.,2015).

É importante ressaltar que tais células são comprovadamente de origem humana (LEVERSON & JORDAN, 1997).

A popularidade da linhagem de células MCF-7 para a investigação do cancer de mama reflete a sua fidelidade a muitos aspectos do cancer da mama na prática clínica, particularmente na gestão de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama receptor-positivo para hormônios (LEE, et al.,2015).

1.6. TESTE DE CITOTOXICIDADE

Os testes *in vitro* são uma ferramenta muito importante para uma análise prévia da atividade de substâncias com potencial terapêutico, isto porque possibilitam a diminuição

do número de animais usados para posteriores testes *in vivo* e, conseqüentemente, permitem a diminuição da dor e sofrimento causados nos animais empregados nestes estudos. Sendo assim, é recomendável do ponto de vista ético, principalmente, além do ponto de vista econômico, que a determinação da citotoxicidade basal seja realizada antes da realização de qualquer experimento *in vivo*. Isto se deve ao fato dos resultados de IC₅₀ (concentração inibitória para 50% das células testadas) obtidos em testes de citotoxicidade *in vitro* poderem ser utilizados para estimar a dose inicial a ser utilizada em testes de toxicidade oral aguda realizados em animais experimentais, com o objetivo de determinar a dose letal 50 (DL₅₀), que corresponde à dose oral que promove a morte de 50% dos animais testados (OECD, 2010; VALADARES, 2006).

O teste de citotoxicidade detecta o potencial de um material produzir efeitos tóxicos *in vitro*, seja comprometendo a integridade das células ou interferindo na sua taxa de crescimento. Tal teste proporciona a seleção de materiais menos tóxicos, para estudos posteriores *in vivo* envolvendo animais e seres humanos. O parâmetro mais investigado pelos testes de citotoxicidade é a viabilidade celular, sendo determinada por diversos processos celulares (KROLL et al., 2009).

Dentre os diversos testes para a avaliação da citotoxicidade/função de substâncias: o teste do corante vermelho neutro, o teste de redução do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazólio (MTT) ou o teste de liberação de enzimas citoplasmáticas como a lactato desidrogenase -LDH), o MTT se destaca como um dos mais empregados (KROLL et al., 2009). A base deste teste é a comparação da citotoxicidade de um agente químico testado a doses não tóxicas de uma substância inócua às células como o meio de cultura.

O ensaio de viabilidade celular pelo MTT, o qual foi empregado no presente estudo, tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. Trata-se de uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal de MTT em cristais de formazana de coloração roxa, a partir de enzimas mitocondriais presentes apenas nas células metabolicamente viáveis (MOSMANN, 1983).

A citotoxicidade é expressa na determinação da concentração dependente que reduz o crescimento celular utilizando-se um corante vital (MTT). A concentração de um agente químico testado reflete a inibição da viabilidade celular em 50% (IC₅₀), calculada usando-se um modelo adequado de curva que expressa a resposta da curva de concentração.

Com base no exposto, o tratamento do câncer de mama abrange várias abordagens terapêuticas, sendo que cada qual possui eficácia e efeitos colaterais particulares. Uma vez

que o número de indivíduos acometidos todos os anos com essa doença aumenta e que a terapia pode falhar, a busca por novas terapias, mais eficazes e com menos efeitos colaterais, se justifica. Para tal, o presente estudo investigou a citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial de EE sobre as células da linhagem de câncer mamário humano sensível a estrógeno MCF-7.

2 METODOLOGIA

2.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO ALFA-BISABOLOL

2.1.1 Óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*

O OE extraído do caule da EE foi gentilmente cedido pela empresa Atlântica S.A.

2.1.2 Alfa-bisabolol

Para isolar o α -B, foi utilizada uma coluna cromatográfica de 36cm x 18mm, empacotada com sílica-gel. Foram pesados 0,2 gramas de OE de EE e aplicados no topo da coluna. A eluição ocorreu em gradiente de hexano:éter dietílico, com as seguintes proporções: 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5. As frações foram coletadas em frascos de 10mL e posteriormente avaliadas por cromatografia de camada delgada, tendo como eluente hexano/éter etílico na proporção de 7:3 e o ácido fosfomolibdico como revelador.

A identificação do analito foi realizada em comparação com um padrão obtido na Sigma-Aldrich. Foi utilizado o equipamento Clarus SQ 8S CGEM da Perkin-Elmer, espectrômetro de massas com fonte de ionização por impacto eletrônico e analisador quadrupolar simples (Q). Coluna Elite-5MS (30m x 0,25mm); He-fluxo de 1,0mL/min; injetor 250°C, Coluna: 50°C, 0-4min, aquecimento 5°C/min até 240°C, aquecimento 15°C/min até 260°C, 260°C/2 min; volume de injeção 1,0 μ L (1%p/v em hexano); split 1:50; pressão da coluna 100kPa; temperatura da interface 250°C; ionização por impacto de elétrons (70eV) operando no modo SIR (monitoramento seletivo de íons). A quantidade de α -B presente na amostra de OE foi de aproximadamente 88%.

A estrutura foi elucidada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de ^{13}C) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio 1 (RMN de ^1H). Os espectros RMN de ^{13}C e RMN de ^1H foram processados no equipamento Bruker a 100 e 400 MHz, respectivamente, usando CDCl_3 como solvente.

2.2 LINHAGENS, CULTIVO E MANUTENÇÃO CELULAR

2.2.1 Aspectos éticos

O presente estudo dispensa aprovação pelo Comitê de Ética, já que o estudo utilizou de linhagens celulares estabelecidas e imortalizadas em laboratório.

2.3. CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS MCF-7 E 3T3

As células MCF-7 (câncer de mama) e 3T3 (fibroblastos) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Marize Campos Valadares, docente e chefe do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia. Os procedimentos de cultivo e manutenção foram supervisionados pela Dra. Alane Pereira Cortez e pela Profa. Dra. Michelle Rocha Parise.

As células MCF-7 e 3T3 foram cultivadas em frascos de cultura de 275 mL com filtro em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino inativado e foram armazenadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, no caso das células 3T3, o meio utilizado foi o *Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)*. Tais células aderentes foram monitoradas constantemente para evitar que faltassem nutrientes necessários para seu crescimento.

A manutenção das células foi realizada em ambiente estéril utilizando uma capela de fluxo laminar horizontal. Em dias alternados, os frascos foram retirados da estufa para serem observados no microscópio invertido para análise do crescimento celular. Após a evidência de crescimento mediante a análise no microscópio, os materiais a serem utilizados bem como o frasco contendo as células, foram manuseados dentro da capela de fluxo laminar. Com o auxílio de uma pipeta de 5 mL, o meio de cultura contido no frasco foi aspirado e descartado e, em se tratando de células aderentes, as paredes da garrafa foram lavadas com meio de cultura, o qual foi removido e desprezado em seguida para então ser adicionado 1 mL de tripsina a fim de desprender as células aderidas. A garrafa de cultura foi movimentada no sentido horizontal, para que a tripsina percorra toda parede do frasco. O frasco foi incubado em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 3 minutos, para acelerar o processo de desprendimento das células da parede do frasco. Decorridos os 3 minutos, o frasco foi retirado da estufa e, com movimentos leves na parede do frasco, auxiliando no desprendimento das células que estarão aderidas, o mesmo foi levado ao microscópio para análise das células.

Ao observar o desprendimento das células da parede da garrafa ao microscópio, estas foram levadas novamente para o fluxo, onde foram adicionados 1 mL de soro fetal bovino

para inativação da tripsina e 5 mL de meio de cultura RPMI-1640/DMEM. Com o auxílio de uma pipeta foi realizada a lavagem com meio RPMI-1640/DMEM por toda parede do frasco, por pelo menos 10x até que todas as células se desprendam completamente. Após realização deste processo, foi feita a retirada de 5 mL da suspensão celular para posterior contagem celular. O volume restante dentro da garrafa de cultura (2mL) foi utilizado para a manutenção celular, sendo este volume completado com 16 mL de meio de cultura RPMI-1640/DMEM e 2 mL de soro fetal bovino inativado, obtendo-se assim uma solução de 20 mL. A garrafa foi levada até a estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 48h, após esse tempo foi feita uma nova manutenção.

2.4 CONTAGEM DE CÉLULAS MCF-7 E 3T3

A contagem de células foi realizada em contador automático (Automated Cell Counter TC20, Bio-Rad, Califórnia, EUA). Para tal, em um eppendorf foram colocados 10µL de azul de Trypan 0,40% e 10µL de suspensão celular. Após serem homogeneizados, foram colocados 10µL na lâmina e esta foi inserida no contador. Assim, em aproximadamente 30 segundos, o número de células e a viabilidade em porcentagem foi mostrada e, a partir do resultado, os valores foram utilizados na fórmula de Determinação do Volume Celular para realizar o plaqueamento. Através do aparelho, também foi possível obter dados da viabilidade celular, sendo o ideal resultados de viabilidade $\geq 90\%$.

2.5 DILUIÇÃO SERIADA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS*

A diluição seriada do OE de EE foi realizada dentro da capela de fluxo laminar horizontal. As diluições foram realizadas em tubos do tipo eppendorf identificados de acordo com sua concentração, data de preparo e nome do composto a ser testado. A sequência das concentrações utilizadas foram: 200µg/mL, 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 12,5µg/mL, 6,25µg/mL, 3,125µg/mL, 1,563µg/mL, 0,7815µg/mL e 0,390µg/mL.

A diluição foi realizada da seguinte forma: No 1º Eppendorf: foram adicionados primeiramente 40µL de OE de EE e 2µL de DMSO a 1%, e após adicionados 158µL de meio RPMI-1640, posteriormente a amostra foi colocada no vórtex (Agitador de soluções AP56 – Phoenix Lufarco); nos demais eppendorfs: foram adicionados 100µL de meio RPMI-1640. A diluição foi realizada com passagem de 100µL do primeiro eppendorf para o segundo e assim consecutivamente, com o auxílio de pipetas de 200µL, até chegar ao

último Eppendorf onde foram desprezados os 100 μ L restantes. A cada passagem, foi realizada a homogeneização por pelo menos 10 vezes.

2.6 PLAQUEAMENTO DE CÉLULAS MCF-7 E 3T3

O plaqueamento das células MCF-7 e 3T3 foi realizado em placas de cultura celular com 96 poços de fundo chato, apropriadas para células aderentes, utilizando as células obtidas a partir do resultado da Determinação do Volume Celular necessário para cada poço da placa e suspensas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB inativado. O processo ocorreu na capela de fluxo laminar horizontal e a adição do composto teste na placa foi de acordo com a sua concentração. Assim, foram adicionados da menor para a maior concentração, da direita para a esquerda da placa. A placa permaneceu por 24 horas na estufa a 37°C antes da adição do MTT.

2.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DAS CÉLULAS MCF-7 E 3T3

A avaliação do potencial citotóxico do extrato de EE foi realizada pelo método da redução do sal tetrazólico, o MTT, utilizado para avaliar a viabilidade celular. Ao incubar células com o MTT, ocorre a redução desse composto pelas enzimas mitocondriais, ocorrendo uma alteração da coloração amarelada do sal para a coloração arroxeada, formando cristais de formazana. A formação dos cristais de formazana é proporcional a funcionalidade da cadeia respiratória das mitocôndrias.

Três horas antes da revelação, as placas com as células MCF-7 e 3T3 foram retiradas da estufa e levadas para a capela de fluxo laminar onde foram adicionados 10 μ L de MTT (5 mg/mL) nos 96 poços de cada placa. Ao completar as 24 horas de incubação, todo o conteúdo das placas foi desprezado com o auxílio de uma pipeta, e foram adicionados 100 μ L de DMSO para a solubilização dos cristais de formazana eventualmente formados.

As placas foram agitadas em um agitador de placas por 20min e a leitura foi realizada a 540nm em leitor de microplacas para obtenção de resultados. A absorbância obtida das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular. As absorbâncias obtidas para cada concentração testada foram utilizadas para calcular graficamente a relação dose resposta (concentração x viabilidade celular), obtida através de análise de regressão linear com limite de confiança de 95% e o índice de citotoxicidade (IC) foi obtido através de equação da reta gerada.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A interpretação dos resultados foi obtida através da análise de variância (ANOVA), sendo 5% o nível de significância adotado ($p < 0,05$). Para a realização desta análise foi utilizado o teste de Tukey através do programa Graph Pad InStat versão 3.10. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS

3.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS MCF-7 E 3T3 UTILIZANDO O SAL DE MTT

3.1.1 avaliação da citotoxicidade do solvente dmsO (controle do veículo)

Como o oe de ee e o α -b isolado não se dissolvem em meio aquoso (rpmi-1640), sendo o dmsO empregado no presente trabalho por melhor diluir as substâncias dentre outros solventes testados. Em todos os experimentos realizados, o dmsO foi adicionado às células mcf-7 e 3t3 na concentração de 1% pelo período de 24 horas a fim de verificar se tal concentração poderia ser citotóxica, constituindo, portanto, um controle do solvente. Tal concentração foi a máxima concentração de dmsO utilizada para auxiliar na mistura do oe de ee e do α -b isolado com o meio rpmi-1640. Verificou-se que na concentração de 1% o dmsO não foi citotóxico em relação às células mcf-7 incubadas somente com rpmi-1640-c (controle negativo) ($p > 0,05$), mantendo a viabilidade celular das células mcf-7 na porcentagem média de $98,75 \pm 0,74$ e das células mcf-7 em $98,86 \pm 0,40$.

3.1.2 Avaliação da citotoxicidade do OE de EE sobre as células MCF-7 e 3T3

Mediante o ensaio de citotoxicidade verificou-se que tanto as células tumorais mamárias de linhagem MCF-7 como as células de linhagem 3T3 apresentaram sensibilidade ao potencial tóxico do OE de EE. Os valores médios dos IC₅₀ para ambas as células, após 24h de exposição, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Índice citotóxico (IC₅₀) do OE de EE

LINHAGEM	IC ₅₀ ²
MCF-7 ¹	9,49
3T3 ¹	3,12 ± 0,91

¹1X10⁶ CÉLULAS/ML (1X10⁵ CÉLULAS/CAVIDADE)

²-Valores do IC₅₀ determinados por uma regressão linear, expressos em µg/mL e apresentados como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

Observou-se que a citotoxicidade para as células tumorais MCF-7 e basais 3T3 mostrou-se concentração dependente e inversamente proporcional pois, à medida que a concentração aumentou, a viabilidade diminuiu.

3.1.3 Avaliação da citotoxicidade do α -B sobre as células 3T3

Nos ensaios para determinação da citotoxicidade do α -B, verificou-se que os fibroblastos de linhagem 3T3 são sensíveis ao potencial tóxico do α -B. O valor médio do IC₅₀ para células basais após 24h de exposição, está representado na Tabela 3.

Tabela 3- Índice citotóxico (IC₅₀) do α -B

LINHAGEM	IC ₅₀ ²
3T3 ¹	30,23 ± 2,19

¹1X10⁶ CÉLULAS/ML (1X10⁵ CÉLULAS/CAVIDADE)

²-Valores do IC₅₀ determinados por uma regressão linear, expressos em µg/mL e apresentados como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se o efeito citotóxico *in vitro* do OE de EE sobre as células da linhagem MCF-7, assim como a citotoxicidade do OE de EE e de α -B sobre células basais, para tal, empregamos a linhagem de fibroblastos 3T3.

Utilizou-se a linhagem celular do câncer de mama MCF-7 pois tais células não são resistentes às antraciclinas ou outros medicamentos como o tamoxifeno e, por este motivo, é um modelo eficaz para avaliação da atividade antitumoral de diferentes compostos em potencial (CAMPOS et al., 2011; ZHANG et al., 2015). Os fibroblastos 3T3 foram escolhidos para o presente estudo pois, segundo estudos de validação realizados pelo National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative

Toxicological Methods (NICEATM) e pelo European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), os fibroblastos 3T3 são uma das linhagens recomendadas para a realização de testes de citotoxicidade, os quais devem ser rotineiramente considerados antes da realização de estudos de toxicidade aguda camundongos (OECD, 2010). Aliado a isso, os fibroblastos são células associadas à moléculas da matriz extracelular, encontradas na maioria dos órgãos e tecidos do organismo (MCANULTY, 2007).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o OE de EE, após 24 horas de exposição sobre as células MCF-7, apresentou-se citotóxico, evidenciado pela diminuição da viabilidade celular pelo método colorimétrico descrita por Mosmann em 1983, que avalia a viabilidade células pela redução do sal de MTT. Ainda, observou-se que, conforme houve o aumento da concentração do OE de EE, houve o aumento do potencial citotóxico, ou seja, a citotoxicidade demonstrou ser concentração-dependente.

Da mesma maneira, o OE de EE demonstrou ser citotóxico para as células 3T3 após 24 horas de exposição e seu efeito mostrou-se concentração-dependente. No entanto, é possível observar que o IC₅₀ é menor para as células 3T3 quando comparado com o IC₅₀ das células MCF-7, ou seja, a concentração capaz de promover a morte celular de 50% dos fibroblastos é aproximadamente 3 vezes menor que a necessária para promover a morte de 50% das células tumorais, indicando que não há seletividade para as células tumorais, e que a concentração necessária para promover a morte das células tumorais é inviável pois seria tóxica para os fibroblastos.

Os estudos sobre o mecanismo de ação dos OEs são escassos, visto que a maioria destes óleos possuem uma composição química complexa que dificulta a especificidade de ação. Desta maneira, a atividade citotóxica do OE não pode ser atribuída a um único mecanismo de ação, em razão de seus diversos grupos químicos que envolvem diversos sítios de ação nas células. Além disso, os óleos possuem um caráter lipídico que favorece sua entrada nas células pelas membranas plasmáticas, tornando-as mais permeáveis, perdendo íons e outros conteúdos celulares (BAKKALI, et al., 2008).

Da mesma maneira que no caso do OE de EE, a exposição do α -B sobre as células de fibroblastos, por 24 horas, resultou em uma diminuição da viabilidade celular mostrando-se concentração-dependente. Em relação ao IC₅₀ do α -B frente as células 3T3, encontramos em nossos estudos o valor de $30,23 \pm 2,19 \mu\text{g/mL}$. Tal IC₅₀ mostrou-se superior ao do OE de EE sobre as células 3T3, apresentando assim um menor efeito citotóxico sobre essas células, indicando uma maior seletividade para as células tumorais, implicando em uma

maior segurança para a aplicação clínica. Tendo em vista a alta concentração necessária para promover a morte de 50 % das células 3T3, pode-se inferir que o α -B tem maior afinidade pelas células tumorais em detrimento dos fibroblastos.

Corroborando nossos achados, Seki e colaboradores no ano de 2011 demonstraram que o α -B tem atividade antitumoral sobre as células pancreáticas podendo suprimir sua proliferação e sobrevivência mediante a inibição da atividade de Akt, sem causar efeitos colaterais importantes. Ainda, em estudos realizado por Cavalieri e colaboradores em 2004, foi demonstrado que o α -B possui atividade antitumoral seletiva para células de glioblastoma. Darra e colaboradores em 2008, mostraram que o α -B tem atividade antitumoral contra células tumorais pancreáticas sem afetar os fibroblastos. Tal atividade seletiva do α -B sobre as células tumorais pode ser justificado pelo fato do α -B entrar nessas células através das balsas lipídicas, que são membranas enriquecidas por lipídios, estruturas estas que estão presentes em maior quantidade nas células tumorais (PATRA & BETTUZZI, 2007).

Neste presente estudo, não realizamos a avaliação da citotoxicidade do α -B sobre as células tumorais mamárias MCF-7. Além disso, não dispomos na literatura de estudos de citotoxicidade realizados com o α -B *in vitro* sobre células MCF-7. Por outro lado, Costarelli (2010), ao avaliar o efeito do α -B sobre ratos e camundongos, demonstrou uma maior concentração deste composto em glândulas mamárias, sugerindo ser um tecido mais sensível ao acúmulo e subsequente ação do α -B.

Assim, podemos dizer que, o OE de EE, mesmo tendo como principal constituinte o α -B, tem seu perfil de citotoxicidade diferente ao perfil do α -B isolado, sendo o α -B isolado capaz de promover maior efeito citotóxico sobre as células tumorais do que sobre os fibroblastos, uma característica desejável, mas que não foi apresentada pelo OE de EE. Sendo assim, os efeitos citotóxicos do OE de EE, mais pronunciados nos fibroblastos, podem ser em parte ou totalmente causada por seus demais constituintes.

A avaliação da composição química do OE de EE mostrou que este é composto por 88% de α -B. Tais achados estão de acordo com Silvério (2013), que verificou que o OE de galhos de EE, apresenta dois componentes, sendo o β -elemeno (5,6%) e o α -B (93,1%), e os 1,3% restantes são componentes não identificados.

Na extração dos OEs, mesmo se extraídos de uma mesma espécie, pode ocorrer frequentemente uma diferença no teor e na composição química, uma vez que a produção de metabolitos secundários é fortemente influenciada pelo ambiente onde o organismo

produtor está inserido, tendo como fatores responsáveis as variações de sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da planta, bem como órgãos vegetais, tais como temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes altitude, composição atmosférica e ataque de patógenos e herbívoros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; BAKKALI et al., 2008).

Neste sentido, a razão da similaridade do teor de α -B do OE de EE, obtidos de galhos, empregados neste presente estudo com o OE obtido de galhos analisados nos estudos de Silvério (2013), devido ser a mesma parte da planta empregada; e, pelo fato de serem coletadas na mesma região, envolvendo mesmas condições climáticas e geográficas, no caso o estado de Minas Gerais.

O β -elemeno (β -E) tem apresentado eficácia na China em tratamentos de câncer de mama, leucemias, carcinoma no cérebro, fígado, e outros tecidos. Este composto tem como vantagens de sua ação antitumoral: (i) um amplo espectro de ação sobre diversos tipos de tumores, incluindo os resistentes a outras drogas, (ii) tem ação de reverter a resistência de outras drogas e não provoca resistência a múltiplos fármacos, (iii) é bem tolerado por pacientes, devido sua baixa toxicidade. O mecanismo de ação deste composto ainda permanece desconhecido. Estudos recentes demonstram que o β -E tem ação sobre o RNAm dos exossomos de células do câncer mamário, principalmente em casos de resistência a múltiplas drogas. Neste sentido, o β -E isolado reduz a transmissão da quimioresistência, via exossomos, revertendo a resistência pela interrupção do desenvolvimento de células cancerígenas, promovendo uma melhora no tratamento (WANG et al., 2005 *apud* ZOU et al., 2001; ZHANG et al., 2015).

Portanto, caso o OE de EE empregado no presente estudo contenha de fato β -E e o α -B, ambos poderiam ter ação sinérgica, visto que ambos possuem atividade antitumoral.

Neste sentido, Zou e colaboradores (2013) em seus estudos demonstraram que o β -E tem ação sinérgica com os fármacos quimioterápicos taxanos paclitaxel e docetaxel contra células de câncer de ovário e de próstata *in vitro*. Ainda, os autores observaram que a co-administração de β -E e um taxano em concentração muito baixa (micromolar) elevou a taxa de formação de micronúcleo e percentagem de interrupção mitótica em ambas linhagens celulares, em comparação com o tratamento com qualquer dos agentes utilizados isoladamente. Entretanto, o tratamento com β -E isolado não causou um aumento significativo na taxa de formação de micronúcleo ou na porcentagem de interrupção mitótica quando comparados com as taxas de células de controle não tratado. No entanto, o tratamento com β -E e um taxano reduziu significativamente a viabilidade celular e

aumentou a apoptose celular. Um mecanismo explicado pelos autores foi a eficácia citotóxica reforçada deste tratamento de combinação e um aumento induzido por β -E no influxo dos taxanos nas células cancerosas através do aumento de sua permeabilidade, foi proposto também que o β -E pode competir com os taxanos por sítios na bomba de efluxo, aumentando, portanto, o acúmulo intracelular e atividade dos taxanos ou ainda, segundo os mesmos, a ação antitumoral sinérgica do taxano com o β -E pode resultar em indução da apoptose e maior bloqueio do ciclo celular.

Baseado no exposto, há uma possibilidade do β -E aumentar o influxo de α -B nas células MCF-7 e 3T3, competindo pelo sítio na bomba de efluxo, de modo que a atividade citotóxica do OE de EE seja mais pronunciada nas linhagens celulares testadas quando comparadas com ao α -B isolado.

Em razão dos resultados apresentados, é importante ressaltar que os dados de experimentação *in vitro* não podem ser comparados com os processos que ocorrem em organismos vivos. Isso porque em incubações *in vitro* não ocorre o acúmulo de metabolitos no meio de cultura devido à ausência das vias de biotransformação e excreção como acontece normalmente *in vivo*. Portanto, os testes *in vitro* são utilizados apenas para auxiliar e direcionar a realização de novas pesquisas farmacológicas de maior complexidade (BABICH & TIPTORB, 2002). Os resultados de testes *in vitro* devem ser analisados como parte de ensaios necessários para aplicação terapêutica dos compostos e para posterior teste *in vivo*.

5 CONCLUSÃO

O α -B é mais promissor agente tumoral que o OE de EE, visto que a literatura apresenta sua citotoxicidade sobre as células tumorais mamárias e, segundo nossos achados, sem alta citotoxicidade sobre fibroblastos 3T3. No que diz respeito ao OE de EE, os demais constituintes do OE precisam ser avaliados isoladamente ou de forma combinada com o α -B a fim de identificar qual (is) o (s) componente (s) responsável(eis) pela elevada citotoxicidade encontrada para fibroblastos 3T3.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A. **Pathways to breast cancer recurrence**. International Scholarly Research Notices Oncology, 2013.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** Química Nova, vol.28, n.1, p.118-129, 2005.

American Cancer Society – ACS. **Types of breast cancers.** Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

ANDRADE, A.M.; GOMES, S.S. **Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de Eucalyptus citriodora Hook.** Floresta e Ambiente. 2000 (7): 181-9.

ARAÚJO, L. C. **VANILLOSMOSIS ERYTHROPAPPA (DC) Sch.Bip: sua exploração florestal.** Rio de Janeiro. Escola nacional de agronomia, 1944.

BABICH, H.; TIPTORB, D. A. **In vitro response of human gingival epithelioid S-G cells to minocycle.** Toxicol. in vitro, v.16, p.11-21, 2002.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, I. **Biological effects of essential oils – A review.** Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 446-475, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **ABC do câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer.** Rio de Janeiro: Inca, 2011. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>. Acesso em: 22 de julho de 2016.

_____. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>> Acesso em: 03 de outubro de 2018.

_____. **Tipos de câncer de mama.** Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/diagnostico1>> Acesso em: 15 de julho de 2016.

_____. **Controle do câncer de mama.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/publicacoes/ConsensoIntegra.pdf>>. Acesso em: 23 de julho de 2016.

_____. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil.** Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf>. Acesso em: 10 de junho de 2016.

_____. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 08/05/2020.

_____. **Estimativa 2020: Tratamento para o câncer de mama** Disponível em:<
<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/acoes-de-controlado/tratamento>>.
 Acesso em: 08/05/2020.

BRAUN NA, MEIER M, KOHLENBERG B, HAMMAERSCHMIDT F-J 2003. **Two new bisabolene diols from the stem wood essential oil of *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz- Bip. (Asteraceae).** *J Essent Oil Res* 15: 139-142.

BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M.C.F. **Fatores prognósticos em câncer de mama.** Comunicação em Ciências da Saúde, 2011.

CAMPOS, E. C.; O'CONNELL, J.L.; MALVESTIO, L.M.; ROMANO, M.M.D.; RAMOS, S.G.; CELES, M. R. N.; PRADO, C. M.; SIMÕES, M. V. ; ROSSI, M. A. **Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy.** *European Journal of Pharmacology*, v. 670, p.541-553, 2011.

CAPELOZZI, V.L. **Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão.** *Jornal Pneumologia*, 2001.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira.** Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640p.

Cavaliere E, Mariotto S, Fabrizi C, de Prati AC, Gottardo R, Leone S, Berra LV, Lauro GM, Ciampa AR, Suzuki H. **Alpha-Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Mar 12;315(3):589-94.

CARVALHO-FILHO et al. **Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil.** *Rev. Bras. Farmacog.* 2006 (16):24-3

COSTARELLI, L., MALAVOLTA, M., GIACCONI, R., CIPRIANO, C., GASPARINI, N., TESEI, S., PIERPAOLI, S., ORLANDO, F., SUZUKI, H., PERBELLINI, L., PIACENZA, F., EMANUELLI, M., MOCCHIGIANI, E. **In vivo effect of alpha-bisabolol, a nontoxic sesquiterpene alcohol, on the induction of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice.** *Oncol Res*. 2010;18(9):409-18.

COWIE. J. M. G. **Polymers: Chemistry & Physics of modern materials.** New York, Chapman & Hall, p.210-213, 1991.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J. de A.; ALENCAR, J.W. de e MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza: Ed. da UFC, 1981.

CRYSTAL, P.; STRANO, S.D.; SHCHARYNSKI, S.; KORETZ, M.J. **Using sonography to screen women with mammographically dense breasts.** *American Journal Roentgenology*, 2003.

DARRA, E.; ABDEL-AZEIM, S.; MANARA, A.; SHOJI, K.; MARÉCHAL, J.D.; MARIOTTO, S.; CAVALIERI E.; PERBELLINI, L.; PIZZA, C.; PERAHIA, D.; CRIMI, M.; SUZUKI, H. **Insight into the apoptosis-inducing action of α -bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid**. Elsevier, p.113-123, 2008.

DINIZ, J.A. **Análise sazonal de α -bisabolol no óleo essencial de Siparuna guianensis da microrregião de viçosa e sua atividade carrapaticida**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, p.67, 2013.

DONATI, A.; CASTRO, L.G.M. **Efeitos colaterais cutâneos de quimioterapia com taxanos. O ponto de vista dermatologista**. An Bras Dermatol, v.86, p.755-758,2011.

DOUBLE Neubauer ruled metallized counting chambre. **Science Services**, 2016.

FETT-CONTE, A.C.; VENDRAME-GOLONI, C.B.; HOMSI, C.M.; BORIM, L.N.B.; ZOLA, P.A.; RICCI, O. **Estudo cromossômico no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de leucemia do Hospital de Base, São José do Rio Preto – SP**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2000.

GILLILAND F.D.; JOSTE N.; STAUBER P.M.; CAÇA W.C.; ROSENBERG R.; REDLICH G.; CHAVE CR. **Biologic characteristics of interval and screendetected breast cancers**. J Natl Cancer Inst., v. 92, p. 743-749, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova, v. 30, p. 374-381, 2007.

INUMARU, L.E.; SILVEIRA, E.A.; NAVES, M.M.V. **Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática**. Cadernos de Saúde Pública, p.1259-1270, Rio de Janeiro, julho de 2011.

KOMEN, S. G. **Quimioterapia e efeitos colaterais**. Instituto espaço de vida, 2010.

KOCK, H. A.; PEIXOTO, J. E.; NEVES, A. L. E. **Análise da infra-estrutura para a mamografia**. Radiologia Brasileira, 2000.

KROLL, A.; PILLUKAT, M. H.; HAHN, D.; SCHNEKENBURGER, J. **Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Amsterdam: v. 72, n. 2, p. 370-377, june 2009.

LEE, A.V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N.E. **MCF-7 Cells- Changing the course breast cancer research and care for 45 years**. Journal of the National Cancer Institute, vol.107, n.7, 2015.

LEVENSON, A.S.; JORDAN, V.C. **MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line**. Cancer Research, vol.57, p.3071-3078, 1997.

LEWIN, G. **Académie Nationale de Pharmacie**, 2014. Disponível em: < http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_4%C3%89pirubicine.png&filetimestamp=20140904124443 > Acesso em 03 de outubro de 2018.

LIMA, F.W.J.; DANTAS-BARROS, A.M.; SOARES, B.M.; SANTOS, D.A.; RESENDE, M.A.; CARVALHO, M.A.R.; SIQUEIRA, E.P.; NELSON, D.L. **The composition and anti-microbial activity of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* (DC) Macleish (Candeia)**. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants, vol.3, no.1, 2013.

LOPES, C.M.; MONTEMOR NETTO, M.R.; MANSANI, F.P.; STIVAL, R.S.M.; CASSAPULA, M.R.; OLIVERIA, T.F.B. **Clinical, histomorphological, and therapeutic prognostic factors in patients with triple-negative invasive breast cancer**. Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial, vol.51, n.6, p.397-406, 2015.

LOPES, J.N.C.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; RODRIGUES, D.C.; GOTTLIEB, O. R. **Chemical variability of *Vanillosmopsis erythropappa***. An. Acad. Bras. Ciências.1991 (63):21-4.

MATTOS, L.L.; MACHADO, L.N.; SUGIYAMA, M.M.; BOZETTI, R.M.; PINHAL, M.A.S. **Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais**. Arquivo médicos do ABC, p.19-25, 2005.

MARTY, M.; EXTRA, J.M.; GIACCHETTI, S.; CUVIER, C.; ESPIE, M. **Toxaids: a new class of cytotoxic agents**. Nouv rev fr hematol, v36, p25-28, 1994

MCANULTY, R.J. **Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease**. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, n.39, p.666–671, 2007.

MORI, C. L. O. **Análise das características da madeira e do óleo essencial de candeia-*Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish, da região de Aiuruca, MG**. Tese, 2008.

MOSMANN, Tim. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays**. Journal of Immunological Methods., 1983.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests**. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, 2010. No. 129.

PATRA, S.K.; BETTUZZI, S. **Epigenetic DNA-methylation regulation of genes coding for lipid raft-associated components: a role for raft proteins in cell transformation and cancer progression (review)**. Oncol Rep., vol.17, p.1279-1290, 2007.

PEROU, C. M., SERLIE, T., EISEN, M. B., RIJN, M.V., JEFFREY, S. S., RESS, C. A., POLLACK, J. R., ROSS, D. T., JOHNSEN, H., AKSLEN, L. A., FLUGE, O., PEGAMENSCHIKOV, A., WILLIAMS, C., ZHU, S. X., LONNING, P. E., BERRESEN-

DALE, A., BROW, P. O., BOSTSTEIN, D. **Molecular portraits of human breast tumours.** Nature, vol.406, 2000.

PERRI, N. B.; ANDERSON, R. E.; BRENNAN, N. J.; DOUGLAS, M. H.; HEANEY, A. J.; MCGIMPSEY, J. A.; SMALLFIELD, B. M. **Essential oils from dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites.** J. Agric. Food Chem. 1999 (47):2048-54.

PIRANDA, N. D.; FREITAS-ALVES, D. R.; VIANNA-JORGE, R. **Farmacogenética e implicações terapêuticas no câncer de mama.** Revista Brasileira de Cancerologia, p.449-452, 2013.

PRADO, B.B.F. **Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer.** Revista Ciência e Cultura, vol.66, no.1. São Paulo, 2014.

ROGERS, K.; TIKKANEN, A. **Breast cancer.** Britannica Academic. Disponível em: <<http://academicebritannica.ez49.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/16308/history>>. Acesso em: 15 de julho de 2016.

SASCO, A. J. **Breast cancer and environment.** Hormone Research, vol.60, 2003.

SCOLFORO, J. R. S; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C.; MELLO, J. M. ACERBI JUNIOR, F. W. **Manejo sustentável de candeia *Eremanthus erythropappus* e *Eremanthus incanus*.** Relatório Técnico Científico. Lavras. UFLA-FAEPE, 350 p., 2002.

SEKI, T.; KOKURYO, T.; YOKOHAMA, Y.; SUZUKI, H.; ITATSU, K.; NAKAGAWA, A.; MAZUTANI, T.; MIYAKE, T.; UNO, M.; YAMAUCHI, K.; NAGINO, M. **Antitumor effects of α -bisabolol against pancreatic cancer.** Cancer Science, vol. 102, n. 12, p.2199-2205. Dezembro, 2011.

SERPE, L.; **Conventional Chemotherapeutic Drug Nanoparticles for Cancer Treatment.** Nanomaterials for Cancer Therapy, 2006.

SILVA GD, SANTOS, M. A. D. **“Será que não vai acabar nunca?”: perscrutando o universo do pós-tratamento do câncer de mama.** Florianópolis Enferm, 2008.

SILVA, B.C.; FERNANDES, R.C.; MARTINS, K.A.; MACHADO, M.G. **Influência da quimioterapia no peso corporal de mulheres com câncer de mama.** Comunicação em Ciências da Saúde, 2010.

SILVÉRIO, M.S. **Estudo químico e farmacológico de *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz Bip. (Asteraceae).** Rio de Janeiro, 94 p. (Dissertação de Mestrado -Farmacologia e Terapêutica Experimental) Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

SILVÉRIO, M.S.; VIEIRA, G.D.V.; PINTO, M.A.O.; ALVES, M.S.; SOUSA, O.V. **Chemical composition and biological activities of essential oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish (Asteraceae).** Journal Molecules, 2013.

SKOULA, M.; ABBES, J.E.; JOHNSON, C.B. **Genetic variation of volatile oils and rosmarinic acid in populations of *Salvia sufruticosa* Mill. growing in Greece.** Bioch. Syst. Ecol. 2000 (28):551-61

SOULE, H. D., VAZEGUES, J., LONG, A., ALBERT, S., BRENNAN, M., **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.** J Natl Cancer Inst. 1973;51(5):1409–1416.

SOUSA, O. V.; DUTRA, R. C.; YAMAMOTO, C. H.; PIMENTA, D. S. **Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch.** Rev. Bras. Farm., 89(2): 113-116, 2008.

SOUSA, O.V.; OLIVEIRA, M.S.; RABELLO, S.V.; CUNHA, R.O.; COSTA, B.L.S.; LEITE, M. N. **Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. . Asteraceae.** Rev. Bras. Farmacog. 2003 (13):50-3.

SOUZA, M. V. N. **Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer.** Química Nova, v. 27, p. 308-312, 2004.

TEIXEIRA, M. C. B.; NUNES, Y. R. F.; MAIA, K. M. P.; RIBEIRO, R. N. **Influência da luz na germinação das sementes de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Shuh. Bip.).** In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICA, 28., 1996, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: SBB. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 1996. P. 35-41.

TOMIC, M., POPOVIC, V., PETROVIC, S., STEPANOVIC-PETROVIC, R., MICOV, A., PAVLOVIC-DROBAC, M., COULADIS, M., **Antihyperalgesic and Antiedematous Activities of Bisabolol-Oxides-Rich Matricaria Oil in a Rat Model of Inflammation.** Phytother res. 2013.

URBAN, L.A.B.D.; SCHAEFER, M.B.; DUARTE, D.L.; SANTOS, R.P.; MARANHÃO, N.M.A; KEFALAS, A.L.; CANELLA, E.O.; FERREIRA, C.A.P.; PEIXOTO, J.E.; CHALA, L.F.; COSTA, R.P.; FRANCISCO, J.L.E.; MARTINELLI, S.E.; AMORIM, H.L.E.; PASQUALETTE, H.A.; PEREIRA, P.M.S.; CAMARGO JR., H.S.A.; SONDERMANN, V.R. **Recomendações do Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, da Sociedade Brasileira de Mastologia e da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia para rastreamento do câncer de mama por métodos de imagem.** Radiologia Brasileira, p.334-339, 2012.

VALADARES, M.C. **Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”.** Revista Eletrônica de Farmácia, Goiânia: vol.3, no.2, p.93-98, nov.2006.

VESELÁ, D.; AMAN, D.; VALTEROVÁ, I.; VANEK, T. **Seasonal variations in the content of taxanes in the bark of *Taxus baccata* L .** Phytochem. Anal. 1999 (10):319-21.

VICHNEWSKI, W.; LOPES, J. N. C.; SANTOS-FILHO, D.; HERZ, W. **15-Deoxygoyazensolide, a new heliangolide from *Vanillosmopsis erythropappa*.** Phytochemistry. 1976 (15):1775-6.

VIEIRA, R.F.; GRAYER, R.J.; PATON, A.; SIMON, J.E. **Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonóides and RAPD markers.** Bioch. Syst. Ecol. 2001 (29):287-304.

ZOU, L.; LIU, W.; YU, L. **Beta-elemene induces apoptosis of K562 leukemia cells (in Chinese).** Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, vol.23, p.196–198, 2001.

ZOU B, LI QQ, ZHAO J, LI JM, CUFF CF, REED E. **β -Elemene and taxanes synergistically induce cytotoxicity and inhibit proliferation in ovarian cancer and other tumor cells.** Anticancer Res. 2013 Mar;33(3):929-40.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; YAO, Y.; ZHONG, S.; ZHIAO, J.H.; TANG, J.H. **β -Elemene Reverses Chemoresistance of Breast Cancer Cells by Reducing Resistance Transmission via Exosomes.** Cellular Physiology and Biochemistry, v. 36, p. 2276-2286, 2015.

WANG, G.; LI, X.; HUANG, F.; ZHAO, J.; DING, C.; CUNNINGHAM, C.; COAD, E.; FLYNN, D.C.; REED, E.; LI, Q.Q. **Antitumor effect of b-elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death.** Cell. Mol. Life Sci., vol.62, p.881-893, 2005.

WILLIAMS, C. L.; STANCEL, G. M. **Estrogênios e progestogênios.** In: HARDMAN, J. G. et al. (Ed.). Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 9ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p.1055

World Health Organization - WHO. **All Cancers (Breast Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.** Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 08 de julho de 2016.

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research - WCRF. **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective.** Washington DC: American Institute for Cancer Research, 2007.