

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

LUIZ FELIPE BIUK

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Juniperus communis* L.
(ZIMBRO)**

PONTA GROSSA

2023

LUIZ FELIPE BIUK

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Juniperus communis* L.
(ZIMBRO)**

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

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

PONTA GROSSA

2023

B624 Biuk, Luiz Felipe
Avaliação do potencial antitumoral, antioxidante e antimicrobiano do óleo essencial de *Juniperus communis* L. (Zimbro) / Luiz Felipe Biuk. Ponta Grossa, 2023.

88 f.

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

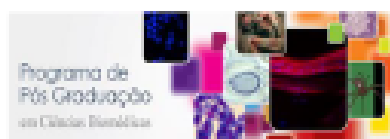
Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre.

1. Nci-h292. 2. Câncer - pulmão. 3. Antioxidante. 4. Microatmosfera. 5. Volatilidade. I. Kanunfre, Carla Cristine. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fisiologia e Fisiopatologia. III.T.

CDD: 616.2



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA 04/2023 DO MESTRANDO Luiz Felipe Biuk REALIZADA NO DIA 25 DE AGOSTO DE 2023, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

No dia vinte e cinco de agosto do ano de dois mil e vinte três, às 9h00min, através do sistema de web conferência da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) via plataforma GoogleMeet – NUTEAD/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 do mestrando LUIZ FELIPE BIUK na linha de pesquisa “Pesquisa de compostos com atividades biológicas”, constituída pelas demais Doutoradas (membros titulares): Profa. Dra. Beatriz Helena Noronha Sales Maia – UFPR (membro externo a UEPG) e Profa. Dra. Danielle Cristyane Kalva (membro interno ao PPG/UEPG). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Juniperus communis* L. (ZIMBRO)”. Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como aprovado. Considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, a aluna deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2013, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre - UEPG/PR

Profa. Dra. Beatriz Helena Noronha Sales Maia – UFPR/PR

Profa. Dra. Danielle Cristyane Kalva – UEPG

Ponta Grossa, 25 de agosto de 2023.

Pró – Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, biologia celular e molecular e fisiologia e fisiopatologia – ppgbiomedicas@uepg.br
Av. Carlos Cavalcanti, 4745 – Ponta Grossa – Paraná – Brasil – CEP: 84030-900

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo amor, incentivo e apoio.

À minha orientadora professora Dr^a. Carla Cristine Kanunfre pela sua grande dedicação, confiança, paciência, ensinamentos e pelas oportunidades concedidas.

Aos meus amigos e grandes incentivadores Alexia, Ane, Frederico, Leonardo, Luara, Marcelo, Mariane e Vitória presentes em todos os momentos de angústia e alegria, sempre dispostos a me ouvir, me acolher e a me ajudar no que fosse preciso.

Aos colegas e ex-colegas do laboratório M-59, Jacqueline, Mariele, Marilene, Lucas, Tatiana e Laura por todos os auxílios, conversas e laços formados. Ao técnico Marcelo Paulo Bueno por todo o companheirismo, amizade, auxílio e ensinamentos passados.

Aos colegas de turma, especialmente à Tayná Banckes pela troca de conhecimentos, amizade e apoio.

Ao professor Luis Antonio Esmerino por todo o auxílio nos experimentos, pela paciência e pelos ensinamentos passados.

À professora Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia pelo auxílio na análise do óleo.

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

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

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

“Do your best to trust all the rays of light”.

(Ella Marija Lani Yelich-O'Connor)

RESUMO

Os óleos essenciais (OEs) além de possuírem diversas atividades farmacológicas, são compostos por componentes voláteis, que, por meio de inalação, podem ser entregues diretamente aos tecidos da via respiratória. Essa propriedade torna interessante investigar os efeitos de sua fase vapor comparando-as com a fase líquida frente ao tratamento de doenças desta via. Objetivou-se nesse trabalho avaliar o potencial antitumoral, antioxidante e antimicrobiano do OE de *Juniperus communis* L. (zimbro) nas suas fases líquidas (FL) e vapor (FV). Como estratégia experimental, as células NCI-H292 de carcinoma de pulmão e MRC-5 de fibroblastos de pulmão (controle) foram utilizadas nos ensaios de avaliação do potencial antitumoral. Os tratamentos com o OE foram realizados pelo período de 24h com a FL (5-2000 µg/mL/poço) e com a FV (25-16000 µg/mL/poço). A viabilidade celular foi determinada pelos ensaios de redução de Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT) e de coloração de proteínas com sulforodamina B (SRB), a partir dos quais foram calculados os valores de CIL_{50} e índice de seletividade (IS), além disso foi realizado o ensaio Scratch para avaliação da proliferação celular. Ambas as fases do OE reduziram a viabilidade da linhagem tumoral de forma dose dependente. Nos ensaios de MTT e SRB, foram obtidos os valores de IS respectivos de 4,43 e 5,32 µg/mL para a FL e de >20 e 7,01 µg/mL para a FV. O ensaio de Scratch demonstrou redução da proliferação celular em 66% e 35,7% para a FL e FV respectivamente. Para os ensaios de detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs), utilizou-se o composto DCFH-DA com o intuito de se avaliar o potencial antioxidantes do OE. Esse ensaio, quando empregando concentrações não citotóxicas, indicou que o OE, em ambas as fases, aumentou a produção basal de EROS intracelular da linhagem de macrófagos J774. Todavia, na presença de peróxido de hidrogênio, o OE reduziu a produção EROS. A avaliação da atividade antimicrobiana da FL do OE foi realizada frente as cepas de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, e *C. albicans* 10231 e 14053, submetidas aos ensaios de macrodiluição em caldo nas concentrações de 31,25-4000 µg/mL. Para a FV foram realizados os ensaios de microatmosfera, utilizando os valores de CIM_{50} obtidos do ensaio anterior. Nos ensaios de macrodiluição os valores de CIM_{50} obtidos foram de 1000, 1000, 250 e 500 µg/mL para *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* 10231 e *C. albicans* 14053, respectivamente, sendo que os valores de CIM_{90} foram obtidos somente com as cepas fúngicas. Nos ensaios de microatmosfera para a FV somente as duas cepas de *C. albicans* demonstraram a formação de zona/halo de inibição de crescimento, com o diâmetro entre 3,5mm e 3,8mm. A partir da pré-seleção das cepas ATCC com maior sensibilidade, cepas orais clínicas de *C. albicans*, foram testadas para comparação do efeito do OE. Em apenas uma cepa destas (34C) houve redução da viabilidade com forte efeito do OE de zimbro na FL (CIM_{50} de 250 µg/mL) e zona de inibição de 4,7 mm na FV. Em conclusão, os resultados obtidos indicam que ambas as fases do OE de zimbro apresentam efeito antitumoral e antioxidante (em células estimuladas), sendo ambos mais expressivos na FL. A FL e a FV também possuem efeitos antimicrobianos, todavia, respectivamente, moderado e baixo. Considerando os potenciais terapêuticos do OE revelados neste estudo e a possibilidade do emprego da via alternativa de administração da fase vapor, a inalatória, se torna importante investigar os possíveis mecanismos de ação desse OE.

Palavras-chave: NCI-H292. Câncer de pulmão. Antioxidante. Microatmosfera. Volatilidade.

ABSTRACT

Essential oils (OEs) in addition to having several pharmacological activities, are made up of volatile components, which, through inhalation, can be delivered directly to the tissues of the respiratory tract. This property makes it interesting to investigate the effects of its vapor phase by comparing them with the liquid phase in the treatment of diseases using this route. The objective of this work was to evaluate the antitumor, antioxidant and antimicrobial potential of the EO of *Juniperus communis* L. (juniper) in its liquid (LP) and vapor (VP) phases. As an experimental strategy, NCI-H292 cells from lung carcinoma and MRC-5 cells from lung fibroblasts (control) were used in assays to assess their antitumor potential. Treatments with EO were carried out for a period of 24 hours with FL (5-2000 µg/mL/well) and with VP (25-16000 µg/mL/well). Cell viability was determined by (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (MTT) reduction assays and protein staining with sulforhodamine B (SRB), from which IC₅₀ values and selectivity index (SI) were calculated, in addition the *Scratch assay* was performed to assess cell proliferation. Both phases of the EO reduced the viability of the tumor lineage in a dose-dependent manner. In the MTT and SRB assays, the respective IS values of 4.43 and 5.32 µg/mL were obtained for LP and >20 and 7.01 µg/mL for VP. The *Scratch assay* showed a reduction in cell proliferation by 66% and 35.7% for LP and VP respectively. For the reactive oxygen species (ROS) detection tests, the compound DCFH-DA was used in order to evaluate the antioxidant potential of the EO. This assay, when using non-cytotoxic concentrations, indicated that EO, in both phases, increased the basal production of intracellular ROS of the J774 macrophage lineage. However, in the presence of hydrogen peroxide, EO reduced EROS production. The evaluation of the antimicrobial activity of the LP of the EO was carried out against the strains of *S. aureus*, *K. pneumoniae*, and *C. albicans* 10231 and 14053, submitted to macrodilution assays in broth at concentrations of 31.25-4000 µg/mL. For VP, microatmosphere tests were performed using the MIC₅₀ values obtained from the previous test. In the macrodilution assays, the MIC₅₀ values obtained were 1000, 1000, 250 and 500 µg/mL for *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* 10231 and *C. albicans* 14053, respectively, and the MIC₉₀ values were obtained only with the fungal strains. In the microatmosphere assays for VP, only the two strains of *C. albicans* demonstrated the formation of zone/halo of growth inhibition, with a diameter between 3.5mm and 3.8mm. From the pre-selection of ATCC strains with greater sensitivity, clinical oral strains of *C. albicans* were tested to compare the effect of EO. In only one of these strains (34C) there was a reduction in viability with a strong effect of juniper EO on LP (MIC₅₀ of 250 µg/mL) and an inhibition zone of 4.7 mm on VP. In conclusion, the results obtained indicate that both phases of the juniper EO have antitumor and antioxidant effects (in stimulated cells), both being more expressive in LP. LP and VP also have antimicrobial effects, however, respectively, moderate and low. Considering the therapeutic potential of the EO revealed in this study and the possibility of using the alternative route of administration of the vapor phase, the inhalation, it becomes important to investigate the possible mechanisms of action of this EO.

Keywords: NCI-H292. Lung cancer. Antioxidant. Microatmosphere. Volatility

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de possíveis vias de ação dos OEs.	21
Figura 2 - Diferentes mecanismos de ação dos OEs sobre microrganismos	27
Figura 3 - <i>Juniperus communis</i> L.	32
Figura 4 – Estrutura química do α -pineno e do β -pineno, compostos majoritários do OE utilizado.	32
Figura 5 - Fluxograma da triagem de atividades biológicas do OE de zimbro.	37
Figura 6 - Ilustração da estratégia de semeadura utilizada para avaliar o efeito da fase vapor do OE de zimbro.	40
Figura 7 - Efeito da fase líquida do OE de zimbro em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem tumoral H292.	48
Figura 8 - Efeito da fase vapor do OE de zimbro em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem tumoral H292.	49
Figura 9 - Efeito da fase líquida do OE de zimbro em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem MRC-5.	52
Figura 10 - Efeito da fase vapor do OE de zimbro em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem MRC-5.	53
Figura 11 - Visualização em microscópio óptico do efeito das fases líquida e vapor do OE de zimbro sobre a proliferação celular da linhagem H292 pelo <i>Scratch Assay</i> ...	55
Figura 12 - Efeito das fases líquida e vapor do OE de zimbro sobre a proliferação celular da linhagem H292.	56
Figura 13 - Efeito das fases líquida e vapor do OE de zimbro em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem J774.A.	57
Figura 14 - Formação de EROs em células J774.A tratadas com as fases vapor e líquida do OE de zimbro na presença ou ausência de peróxido de hidrogênio.	59
Figura 15 - Percentual de formação de EROs em células J774.A tratadas com as fases vapor e líquida do OE de zimbro na presença ou ausência de peróxido de hidrogênio.	60
Figura 16 - Teste de macrodiluição em caldo correspondente à avaliação do efeito líquido do OE sobre os microrganismos.	62

Figura 17 - Avaliação do efeito antifúngico e antibacteriano da fase líquida do OE de zimbro em diferentes concentrações.....	63
Figura 18 - Efeito microbicida nas quatro cepas tratadas com a fase líquida do OE de zimbro.	64
Figura 19 - Crescimento das quatro cepas tratadas com a fase vapor do OE de zimbro no teste de microatmosfera.	66
Figura 20 - Avaliação do efeito antifúngico da fase líquida do OE de zimbro em diferentes concentrações.	68
Figura 21 - Crescimento da cepa 34C tratada com a fase vapor do OE de zimbro no teste de microatmosfera.	70
Figura 22 - Papel do OE na aromaterapia e possíveis efeitos ao organismo.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Possíveis formulações do uso de OEs.....	19
Quadro 2 - Descrição de possíveis efeitos dos OEs e seus desfechos nas células tumorais.....	22
Quadro 3 - Composição do OE de zimbro adquirido.....	36
Quadro 4 - Comparativo entre as duas fases do OE.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do OE de zimbro obtida por cromatografia gasosa	47
Tabela 2 - Valores de CI_{L50} CI_{V50} para a linhagem tumoral H292 após tratamento com o OE de zimbro.	49
Tabela 3 - Valores de CI_{L50} CI_{V50} para a linhagem MRC-5 após tratamento de 24h com o OE de zimbro.....	53
Tabela 4 - Valores de IS do OE de zimbro na fase líquida e vapor sobre as linhagens utilizadas e submetidas ao tratamento de 24h com o OE de zimbro.....	54
Tabela 5 - Concentrações de CI_{M50} utilizadas no teste de microatmosfera	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS - Absorbância

ABTS - [(Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico]

ATP - Adenosina trifosfato

Bax - Proteína X associada ao linfoma de células B2;

Bcl-2 - Linfoma de células B2;

CAT - Catalase;

CDK - Quinases dependentes de ciclina;

CytC - Citocromo C;

CytP450 - Citocromo P450;

CO₂ - Dióxido de Carbono

DCFH-DA - Marcador 2,7-diacetato de diclorofluoresceína

DO - Densidade óptica

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EH - Epóxi-hidrolase;

ETC - Cadeia transportadora de elétrons;

ERNS - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROS - Espécies Reativas de Oxigênio

FRAP - Capacidade antioxidante de redução do ferro

GPx - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione

GST - Glutathione S-transferase;

LPS - Lipopolissacarídeo

mdm2 - Murine double minute 2;

MLC - Concentração letal mínima

mTOR - Proteína alvo da rapamicina;

MTT - (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

NADPH - Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NF- κ B - Factor nuclear kappa B

nm - Nanômetro

OE - Óleo Essencial

ORAC - Capacidade de absorção do radical de oxigênio

PARP - Poli (ADP-ribose) polimerase

PKB - Proteína quinase B;

pPDK1 - Proteína piruvato desidrogenase quinase 1;

PVL - Panton-Valentine leucocidina

QT - Quinona redutase;

RL - Radicais Livres

SOD - Superóxido dismutase;

SRB- sulforodamina B

TBHQ - Terc-butil-hidroquinona

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

UGT - Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase.

μ g - Micrograma

μ L - Microlitro

μ M - Micromolar

SUMÁRIO

SUMÁRIO	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	18
3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	20
3.2.1 Atividade antitumoral	20
3.2.2 Atividade antioxidante.....	24
3.2.3 Atividade antibacteriana.....	26
3.2.4 Atividade antifúngica.....	28
3.3 ESTUDOS COM A FASE VAPOR DOS OES	30
3.4 ZIMBRO (<i>Junipeus communis</i> L.)	31
3.4.1 Atividades biológicas do zimbro e de seu OE	33
3.4.2 Atividades biológicas dos compostos majoritários do OE de zimbro	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 ÓLEO ESSENCIAL	36
4.2 LINHAGENS CELULARES, CONDIÇÕES DE CULTIVO E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	37
4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE LÍQUIDA DO OE DE ZIMBRO	38

4.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO OE DE ZIMBRO.....	39
4.4.1	Ensaio de redução de MTT.....	40
4.4.2	Ensaio de coloração de proteínas	40
4.4.3	Determinação dos valores de CIL50 - fase líquida, CIV50 - fase vapor e índice de seletividade do OE de Zimbros	41
4.4.4	Ensaio de avaliação de migração celular (<i>Scratch Assay</i>) por meio do emprego do corante Rosenfeld	42
4.5	DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE EROS EM CÉLULAS J774.A SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM O OE DE ZIMBRO EM FASE LIQUIDA OU VAPOR	43
4.6	CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS	43
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA POR MACRODILUIÇÃO EM CALDO	44
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE MICROATMOSFERA	45
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE ZIMBRO POR MEIO DE CG/EM.....	47
5.2	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS FASES LÍQUIDA E VAPOR DO OE DE ZIMBRO	47
5.2.1	Linhagem tumoral NCI-H292	47
5.2.2	Determinação da seletividade da fase vapor e líquida do OE de zimbros	52

5.2.3 Avaliação de migração celular por meio do ensaio de “ <i>Scratch Assay</i> ” e emprego do corante Rosenfeld	55
5.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS DAS FASES LÍQUIDA E VAPOR DO OE DE ZIMBRO	57
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OE DE ZIMBRO	62
5.4.1 Teste de Macrodiluição em Caldo	62
5.4.2 Teste de Microatmosfera	65
5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO OE DE ZIMBRO COM CEPAS ORAIS OBTIDAS DE PACIENTES DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.....	68
5.5.1 Teste de Macrodiluição em Caldo	68
5.5.2 Teste de Microatmosfera	70
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
7 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	84
ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética – Parecer nº 131.824.....	86

1 INTRODUÇÃO

A demanda por compostos naturais para o tratamento de patologias tem se intensificado cada vez mais, devido a fatores como baixa toxicidade e baixo impacto ambiental (BHALLA; GUPTA *et al.* 2013). Nesse panorama se destacam as plantas medicinais, as quais, além de estarem presentes de forma ampla na medicina tradicional, se constituem como uma fonte de compostos, já utilizados clinicamente e que possuem uma diversidade de efeitos farmacológicos. Dentre os produtos naturais estudados, se evidenciam os óleos essenciais (OEs), compostos do metabolismo secundário de plantas, constituídos por misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Aos OEs são atribuídas diversas propriedades biológicas, podendo-se citar a anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antioxidante, antiviral, antiparasitária, antidiabética e antimutagênica. Geralmente esses efeitos são atribuídos aos compostos majoritários dos OEs, ou seja, aqueles que se apresentam em maior concentração na sua composição, porém diversos autores apontam como os compostos ditos minoritários, os quais possuem ação sinérgica, podendo potencializar, assim, a ação do OE (SHARIFI-RAD *et al.* 2017).

Considerando a volatilidade dos OEs, eles acabam por se tornar ideais para procedimentos envolvendo nebulizações e/ou inalações (EDRIS, 2007), uma vez que tais compostos voláteis podem ser entregues diretamente aos tecidos das vias respiratórias. Dessa forma, se torna interessante avaliar o uso do OE como um tratamento complementar de doenças da via respiratória, como infecções por microrganismos e o câncer de pulmão, um dos mais frequentes, agressivos e com maior taxa de mortalidade (FERLAY *et al.* 2015). Ademais, devem ser considerados também os estudos de efeitos que possam estar relacionadas com o surgimento de patologias da via respiratória, tal como o estresse oxidativo, um dos principais causadores de doenças pulmonares, incluindo também as neoplasias (LOWE; LUETTICH; GREGG, 2013; RODRIGUES, 2013).

Muitos dos dados presentes na literatura focam apenas no uso da fase líquida dos OEs, desconsiderando o potencial da sua fase vapor. Frente ao exposto se torna interessante uma avaliação comparada de alguns dos efeitos de ambas as fases, estando em foco nesse trabalho a avaliação das propriedades biológicas do OE de Zimbro (*Juniperus communis* L.).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral, antioxidante e antimicrobiano do OE de *Juniperus communis* L. comparando as fases líquidas e de vapor.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a composição do OE de *Juniperus communis* L. na sua fase líquida com os dados descritos na literatura.
- Determinar as concentrações da fase líquida e da fase vapor do OE responsáveis por reduzir a viabilidade das linhagens NCI-H292 (tumoral) e MRC-5 (controle) em 50% (CIL₅₀ e CIV₅₀).
- Determinar o índice de seletividade sobre a linhagem tumoral e controle da fase líquida e da fase vapor do OE.
- Avaliar a atividade do OE sobre a linhagem de macrófagos murinos J774.A quanto à sua produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) de forma basal e estimulada.
- Investigar os efeitos antimicrobianos *in vitro* das fases vapor e líquida do OE de zimbro sobre fungos e bactérias patogênicas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Com uma considerável importância na farmacopéia, os óleos essenciais (OE) são substâncias derivadas do metabolismo secundário de plantas aromáticas e que apresentam alta volatilidade e odor intenso. Estando presentes nas secreções citoplasmáticas das células dessas plantas, se caracterizam por serem misturas complexas, de baixo peso molecular e de baixa densidade, sendo associados principalmente à função de proteção contra insetos e microrganismos, mas também à atração de polinizadores (BAKKALI *et al.*, 2008; ELSHAFIE; CAMELE, 2017).

Os OE são constituídos, principalmente, por dois grupos, o primeiro e principal compreende os terpenoides e terpenos e o segundo os componentes aromáticos, derivados de arilpropanoides. Já em menores concentrações também podem ser encontrados os álcoois, aldeídos, amidas, aminas, cetonas, ésteres e éteres. A composição dos OEs pode apresentar uma variação de até 300 constituintes, dos quais dois ou três são encontrados em maiores concentrações. Tais componentes são denominados como majoritários e a eles, geralmente, são atribuídas as propriedades biológicas da planta. Porém, nem sempre, de forma isolada, serão os responsáveis por tais propriedades, uma vez que a combinação das moléculas presentes em menores concentrações podem gerar efeitos sinérgicos significativos, havendo a possibilidade de a atividade dos compostos majoritários ser modulada pelas moléculas em menor concentração (GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014; RUSSO *et al.*, 2015, ANGELINI *et al.*, 2019).

Além disso, é possível que exista uma variação na sua composição, o que pode estar relacionado à fatores: (1) biológicos como a genética, localização, clima, nutrição, fase do ciclo de vida e estação do ano; (2) método de extração e órgão da planta utilizado (BAKKALI *et al.*, 2008). Mesmo com uma atual diversidade relacionada ao processo de obtenção de OEs, a hidrodestilação é a mais utilizada, permitindo a obtenção do OE das folhas, frutos, flores, sementes, raízes e caule da planta (RUSSO *et al.*, 2015).

Apesar de serem amplamente usados na indústria alimentícia para a aromatização de alimentos e na perfumaria para a produção de cosméticos, os OEs

são, há muitos anos, utilizados na medicina tradicional, a qual atribui a eles as mais diversas atividades farmacológicas (BHALLA; GUPTA *et al.* 2013; GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014). Além disso, eles vêm sendo explorados cada vez mais como alternativas eficazes na complementação de tratamentos com compostos sintéticos, principalmente pelo fato de gerarem menor impacto ambiental e de não acarretarem em efeitos colaterais (BAKKALI *et al.*, 2008; RAUT, KARUPPAYIL, 2014).

Cabe destacar, dentro das atividades farmacológicas dos OEs, as ações antiinflamatória, antioxidante, antiviral, antifúngica, antimicrobiana e também a antitumoral, atribuídas à diferentes mecanismos de ação (BAKKALI *et al.*, 2008; BLOWMAN *et al.* 2018).

Os OEs têm sido utilizados via uso tópico, oral e nasal, sendo que nessa última, as substâncias componentes dos OEs, podem ser absorvidas pelos pulmões ou pela própria mucosa nasal. O uso tópico geralmente está relacionado à desordens musculoesqueléticas ou intertegumentares e, nesse caso, os OEs podem facilmente penetrar a pele por sua ação sobre a bicamada lipídica. A administração oral está relacionada a questões gastrointestinais, urinárias e reprodutivas. Já a via nasal é recomendada em desordens que envolvem o sistema nervoso, uma vez que tais moléculas podem ser transportadas para a os vasos sanguíneos até tecidos cerebrais. Além disso, os OEs se caracterizam por serem excretados facilmente na urina e nas fezes (CHEN, *et al.* 2015; SHARIFI-RAD, *et al.*, 2017; ZANG, YAO, 2019; BAPTISTA-SILVA, *et al.*, 2020).

Para o seu uso existem diferentes formulações, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Possíveis formulações do uso de OEs.

Tipo de Sistema	Formulação
Líquido	Emulsões e soluções líquidas
Semi sólido	Géis.
Sólido	Microcápsulas
Aerossol	Inalação do OE

Fonte: BAPTISTA-SILVA, *et al.*, 2020.

Apesar dos dados presentes na literatura, que indicam os benefícios do uso dos OEs, se torna indispensável a avaliação e seleção da sua dose adequada para uso, uma vez que, mesmo com seus benefícios, ainda há a possibilidade da

ocorrência de efeitos colaterais pela sua toxicidade. Além disso, alterações na composição do OE e a presença de contaminantes também podem ser responsáveis por efeitos adversos, como relatado na revisão de Woolf *et al.* (1999), no qual é ressaltado que, mesmo um OE com baixa toxicidade pode gerar efeitos adversos quando administrados em grandes doses. De fato, tem-se relatos de reações adversas, como exemplo, irritações, urticárias, lesões em mucosas, alergias e tonturas os quais foram atribuídos aos OE de *Mentha pulegium*, *Eucalyptus sp.* e *Cinnamomum cassia* quando utilizados de forma inadequada.

3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

3.2.1 Atividade antitumoral

Inúmeros mecanismos moleculares estão envolvidos na mediação do câncer, a alteração na expressão de proteínas e suas sinalizações modificam o metabolismo celular reprogramando e permitindo o seu crescimento contínuo, podendo chegar em estágios nos quais sua expansão acarreta em eventos como a formação de novos vasos sanguíneos, intensificação da agressividade e migração para outros tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011; PATTERSON *et al.*, 2018).

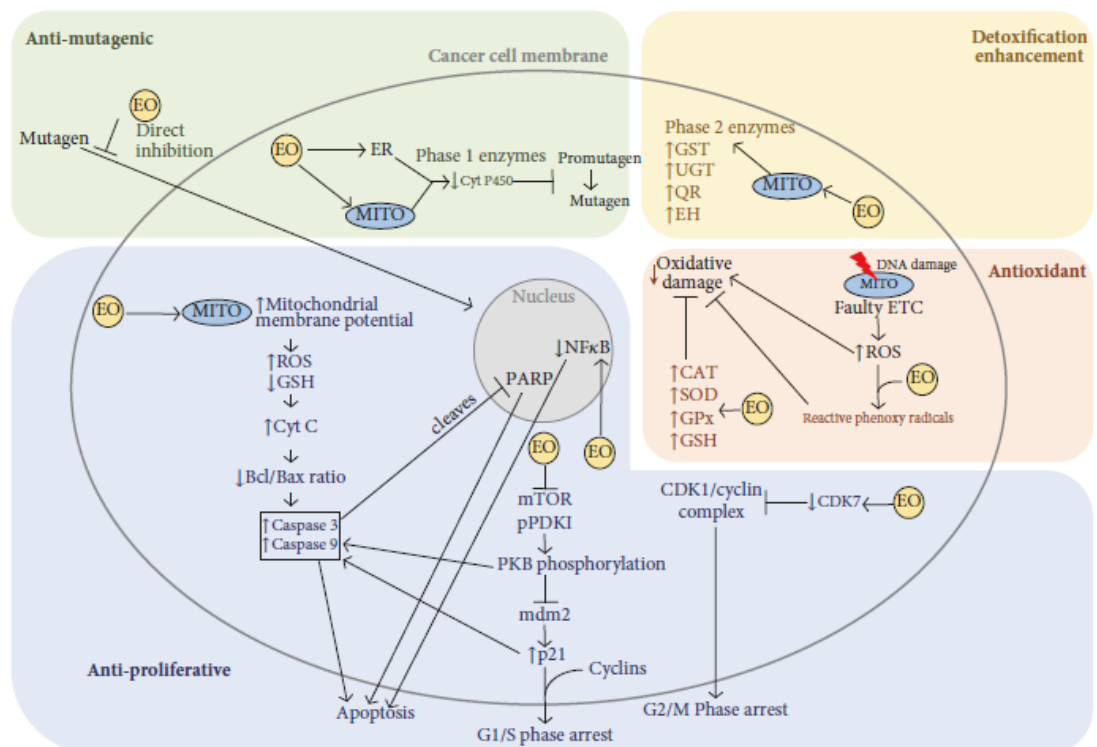
Podendo acometer qualquer órgão do corpo, o câncer é capaz de ser gerado por fatores externos, os quais envolvem alimentação inadequada, consumo de alguns medicamentos e exposição a produtos químicos do ambiente de trabalho, ou fatores internos, como as condições trazidas pela própria hereditariedade, como maior vulnerabilidade ao processo tumoral (INCA, 2021). Destaca-se também as condições epigenéticas, como modificações na cromatina causadas por remodelação e hipermetilação de histonas, sendo elas também consideradas marcadores do desenvolvimento e crescimento tumoral (NEBBIOSO *et al.*, 2018; PATTERSON *et al.*, 2018).

Fatores como o custo financeiro, resistência contra às drogas e efeitos colaterais têm intensificado a busca, na medicina tradicional, por tratamentos alternativos contra o câncer (BHALLA; GUPTA *et al.* 2013; HIRSCH, *et al.* 2017). Dessa maneira, os produtos naturais como os OEs se destacam, uma vez que são considerados fontes de alguns agentes antitumorais utilizados atualmente. Assim, os

OEs têm atraído a atenção em estudos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, principalmente por sua ampla composição de componentes bioativos, o que faz com que eles não possuam apenas um alvo específico para sua ação. Além disso, têm se demonstrado que o uso dos componentes isolados dos OEs pode apresentar um efeito menos potente quando comparado com o seu uso em totalidade (BAYALA, 2014).

A literatura traz que os OEs podem possuir atividade antitumoral por diferentes mecanismos (BHALLA; GUPTA *et al.* 2013; BAYALA, 2014, BLOWMAN 2018), como apresentado na Figura 1 e no Quadro 2. Pode-se citar indução de apoptose, parada do ciclo celular, modulação nos mecanismos de reparo de DNA, aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, além de efeitos antimetástático, antiangiogênico e antimutagênico. Essa atuação na célula é beneficiada, principalmente, pelo fato de que os OEs têm caráter lipofílico, o que facilita a travessia pela membrana celular.

Figura 1 - Esquema de possíveis vias de ação dos OEs.



Fonte: BLOWMAN *et al.* 2018. Bax: proteína X associada ao linfoma de células B2; Bcl-2: Linfoma de células B2; CAT: catalase; CDK: quinases dependentes de ciclina; CytC: citocromo C; CytP450: citocromo P450; EH: epóxi-hidrolase; EO: óleo essencial; ER: retículo endoplasmático; ETC: cadeia transportadora de elétrons; GPx: Glutathione peroxidase; GSH: glutathione; GST: glutathione S-

transferase; mdm2: murine double minute 2; mTOR: proteína alvo da rapamicina; MITO: mitocôndria; NF κ B: fator nuclear- κ B; PARP: poli (ADP-ribose) polimerase; pPDK1: proteína piruvato desidrogenase quinase 1; PKB: proteína quinase B; QT: quinona redutase; ROS: espécies reativas de oxigênio; SOD: superóxido dismutase; UGT: uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase.

Quadro 2 - Descrição de possíveis efeitos dos OEs e seus desfechos nas células tumorais.
(continua)

Ação inicial do OE	Efeito decorrente	Desfecho
Diminuição de mTOR e Desfosforilação de Akt	Aumento da expressão de p21	Indução de apoptose pelo aumento do nível das caspases
		Parada do ciclo celular (fase G1/S) pela ligação às ciclinas
Desfosforilação de Bad	Translocação pela membrana mitocondrial para ligação com proteínas Bcl2	Permite que a proteína Bax promova apoptose
Redução da fosforilação de Mdm2 pela Akt	Aumento da expressão de p53	Indução de apoptose e parada do ciclo celular pelo aumento de p21
Modulação do reparo de DNA por ação na DNA polimerase	Clivagem de PARP	Indução de apoptose
Aumento de EROS	Ativação das caspases 3 e 9	Indução de apoptose
Estresse na membrana mitocondrial	Redução de GSH, despolarização da membrana, liberação do citocromo C, alteração nos níveis de Bcl e Bax	Indução de apoptose causada pela cascata de caspases 3 e 9 e clivagem de PARP
Supressão de MAPK, mTOR e pPDK1	Desfosforilação de PKB, ativação de caspases, desativação de mdm2	Indução de apoptose e parada do ciclo celular pelo aumento de p21
Redução de CDK7	Bloqueio do complexo CDK1/ciclina	Parada do ciclo celular
Alteração da expressão de NF-κB	Ligação de NF- κ B ao DNA da célula tumoral	Indução de apoptose
Inibição de VEGF	Regulação negativa de MMP	Efeito antimetastático e antigênico
Redução do citocromo c e aumento de GST, UGT, QR, e EH	Aumento da desintoxicação	Prevenção de mutagênese

Ligação dos OEs com EROS formando radicais fenólicos que se ligam às ROS	Aumento das enzimas CAT, SOD, GPx, e GSH	Redução do dano oxidativo como mecanismo de prevenção
---	--	---

Fonte: BHALLA; GUPTA *et al.* 2013; BAYALA, 2014, BLOWMAN, 2018

Em relação aos processos de angiogênese e metástase pode ser evidenciado o OE de *Citrus sinensis* L, o qual além de inibir, de forma dose dependente, a proliferação das células tumorais de cólon (SW480 e HT-29) pela indução do aumento dos níveis de Bax/Bcl2l, também levou à inibição do fator de crescimento endotelial e da MMP9 (MURTHY; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2012).

No estudo de CHEN *et al.* (2013) o OE de *Curcuma zedoaria* em ensaios *in vitro*, gerou a inibição de proliferação células de carcinoma de camundongos (linhagens B16BL6 e SMMC-7721), reduzindo a formação de microvasos em uma membrana corioalantóica. Já nos ensaios *in vivo*, o OE reduziu a metástase pulmonar e crescimento do melanoma, com uma diminuição significativa do seu peso, da expressão de CD34 e do número de nódulos tumorais coletados dos camundongos.

Referenciando os mecanismos apoptóticos de ação dos OEs, podemos citar o estudo de Ilhan (2020), no qual foi observado que a linhagem de carcinoma de pulmão que apresenta multi-resistência à drogas (linhagem H69AR), quando submetida a tratamentos com o óleo essencial extraído das folhas da *Vitex agnus castus* L., apresentou a ativação de vias apoptóticas extrínsecas, influenciando na regulação de Bcl-2, Bcl-XL, Bad, Bax, Caspase-8, Caspase-9, e intrínsecas, modulando TRAIL R1/DR4 e TRAIL R2/DR5, proteínas receptoras de morte celular. O autor ainda relatou uma maior seletividade de ação na célula tumoral em relação à linhagem celular normal.

Grande parte dos estudos existentes apoia, que o uso dos OEs possa ser realizado de maneira complementar à terapia convencional. Como no caso do OE de *Zataria multiflora* combinado com a doxorrubicina, uma droga sabidamente antitumoral, que já levou à sensibilização e aumento da produção de EROS com consequente indução de apoptose de células de câncer de próstata (PC3), podendo assim ser reduzido o uso do fármaco e consequentes efeitos colaterais desta droga (ZARE *et al.* 2021).

3.2.2 Atividade antioxidante

Em todos os organismos aeróbios vivos, o processo de oxidação, gerado a partir dos radicais livres, é importante e necessário, uma vez que está relacionado aos processos celulares de regulação do crescimento, produção de energia, sinalização e síntese de biomoléculas. Porém, quando a geração de tais radicais se torna exacerbada, eles acabam por induzir danos a biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, conduzindo ao estado de estresse oxidativo, processo fisiológico gerado pelo desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade do sistema biológico de eliminá-las (ANTHONY; DEOLU-SOBOGUN; SALEH, 2012; PIZZINO *et al.*, 2017).

Por conseguinte, se desenvolveram mecanismos celulares de defesa antioxidante, de forma a reduzir os danos oxidativos a partir da sua neutralização. Tal sistema de defesa se revela ainda mais importante ao considerar que o estresse oxidativo está diretamente relacionado ao surgimento e/ou agravamento de doenças como câncer, catarata, distúrbios neurodegenerativos, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e processos inflamatórios além do aceleração do processo de envelhecimento (ANGELINI, 2018). Essa proteção, contra os radicais livres, é atribuída aos sistemas antioxidantes endógeno e exógeno, sendo o primeiro de origem do próprio organismo e o segundo uma via externa, atribuída à ingestão de substâncias antioxidantes (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000).

As substâncias antioxidantes são aquelas capazes inibir a formação de radicais livres e/ou que possam reagir com eles, podendo causar o seu retardo, neutralização ou interrupção da sua propagação, reduzindo assim o estresse oxidativo (BREWER, 2011; ELSHAFIE; CAMELE, 2017). Dentre os mecanismos de ação destas substâncias temos a eliminação das espécies que dão início à peroxidação, como a hidroxila; decomposição de peróxidos em não-radicaais, como álcoois; ligação à íons metálicos incapacitando geração de EROs ou a decomposição de peróxidos lipídicos (MIGUEL, 2010; BREWER, 2011).

Considerando que nem sempre o sistema antioxidante endógeno terá ação suficiente sobre o organismo para a manutenção do estresse oxidativo e que muitos dos antioxidantes sintéticos utilizados atualmente têm demonstrado efeitos colaterais

à saúde, há o aumento da procura por compostos naturais, principalmente os derivados de plantas, que possam suprir esse efeito (HALLIWELL *et al.*, 2000; LOBO *et al.* 2010).

Nesse cenário se destacam os óleos essenciais, os quais vêm sendo estudados principalmente pelo fato de apresentarem, na sua composição, vários componentes com alta atividade antioxidante, principalmente os terpenoides e os fenóis (MIGUEL, 2010; ELSHAFIE; CAMELE, 2017), os quais estão envolvidos na inibição de formação de radicais livres e na neutralização de danos causados pelo estresse oxidativo.

Na literatura temos exemplos de diversos óleos essenciais com forte atividade antioxidante, como no caso do trabalho de Zardi-Bergaoui *et al.* (2017) no qual o OE de *Beta vulgaris* apresentou uma significativa atividade antioxidante quando avaliado por cinco ensaios diferentes, sendo eles o de redução de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), redução de ABTS [(ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico], FRAP (método de redução o ferro), de catalase e de paraoxonase, no qual nos dois primeiros se encontrou um efeito antioxidante ainda mais potente do que o composto antioxidante BHT (hidroxitolueno butilado), utilizado como controle. Dessa forma tais métodos sugerem que a atividade antioxidante do OE testado pode estar relacionada ao mecanismo de eliminação e prevenção de produção EROs através da inativação de íons metálicos e pela própria intensificação do sistema enzimático de defesa.

Empregando o método de DPPH e ORAC (capacidade de absorção do radical de oxigênio), o OE de *Myric rubra* já apresentou forte atividade antioxidante, mesmo sendo menor do que nos ensaios controles usando o Trolox. Os mecanismos prováveis de ação podem estar relacionados à inibição da peroxidação lipídica e ao sequestro e eliminação de EROs, sendo que tal atividade foi atribuída aos seus compostos majoritários (YIN *et al.* 2019).

Em ensaios *in vitro* utilizando o método de DCFH-DA, que possibilita a detecção de propriedades anti e pró-oxidantes intracelulares, o OE de *Nigella sativa* e um de seus componentes majoritários, a Timoquinona, inibiram significativamente a produção de EROs, com valores de CIL₅₀ de 1,0 µg/ml para o OE e de 0,2 µg/ml para o composto isolado. Os prováveis mecanismos de ação, nesse caso, foram o sequestro e eliminação de EROs e a inibição da peroxidação lipídica (BOURGOU *et al.* 2010).

Considerando que muitos dos ensaios existentes buscam analisar modalidades específicas de atividade antioxidante, cabe ressaltar estudos que possibilitam a análise de um contexto biológico normal, nesse caso se destaca trabalho de Takayama, De-Faria e Almeida (2016) no qual o OE de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) demonstrou atividade antioxidante em ratos, protegendo o seu tecido gástrico que havia sofrido úlceras induzidas por etanol. Os ensaios utilizados pelos autores avaliariam a atividade da mieloperoxidase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase, além da peroxidação lipídica. Os efeitos antioxidantes foram atribuídos aos seus componentes monoterpênicos e aos altos teores de compostos fenólicos.

3.2.3 Atividade antibacteriana

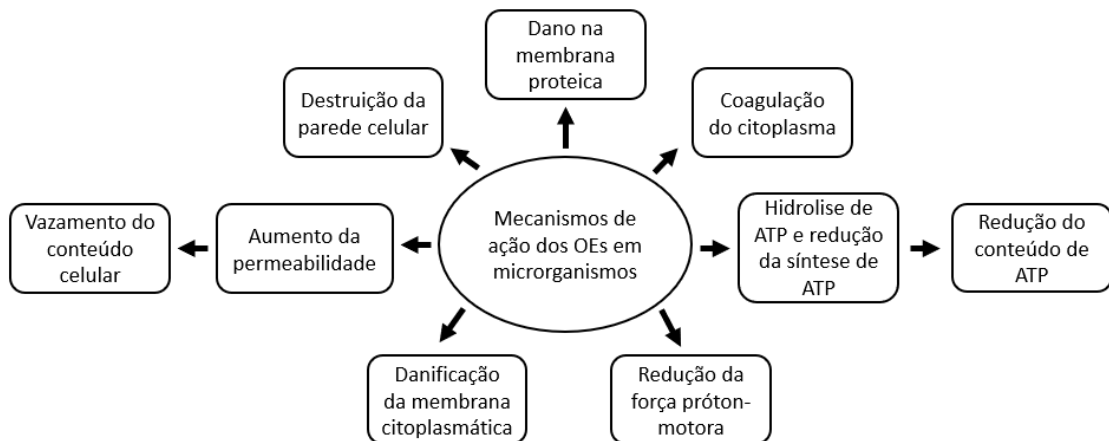
Nas bactérias, tanto gram-negativas, quanto positivas, os OE atuam com seus compostos bioativos se complexando e acumulando na superfície da célula e, graças à sua natureza lipofílica, é possível que ocorra a movimentação desses componentes através dos lipídios das membranas celulares das bactérias. Isso acarreta em um rompimento das estruturas da parede celular as tornando mais permeáveis. Os efeitos antibacterianos podem ser divididos em duas vias, a de restrição de crescimento (bacteriostático) ou pela morte das células (bactericida).

Os efeitos dos OEs geralmente são mais eficientes nas bactérias gram-positivas do que nas negativas, uma vez que o primeiro grupo possui a camada de peptidoglicano ao redor da membrana. Já no segundo grupo, a membrana externa é composta de uma dupla camada de fosfolípidos, ligados à membrana interna pelos lipopolissacarídeos (LPS), principais responsáveis por essa resistência ao atuarem como barreira para macromoléculas e compostos hidrofóbicos (DHIFFI *et al.*, 2016; CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, 2017; BHAVANIRAMYA *et al.*, 2019; VALDIVIESO-UGARTE *et al.*, 2019).

Conforme revisado por Bhavaniramyia *et al.* (2017) e Mutlu-Ingok *et al.* (2020) os principais mecanismos de ação dos OE estão relacionados à própria permeabilização da membrana celular devido a sua destruição ou à formação de poros, influenciando na: manutenção do gradiente de pH; vazamento de conteúdo intracelular como potássio, ATP ou DNA; alterações citoplasmáticas e destruição da

cadeia de transporte de elétrons levando à parada de produção de energia e de formação de proteínas necessárias para a sobrevivência da célula. Além disso, os OEs podem ter influência na comunicação celular entre as bactérias, impedindo a formação de biofilmes, responsáveis pelo aumento da resistência das bactérias aos fármacos. Alguns desses eventos estão representados na Figura 2.

Figura 2 - Diferentes mecanismos de ação dos OEs sobre microrganismos bacterianos e fúngicos.



Fonte: Bhavaniramyia *et al.* (2017) (adaptado).

Vários estudos, conforme revisado por Dhifi *et al.* (2018), Chouhan, Sharma, e Guleria (2017) e Sharifi-Rad *et al.* (2017) demonstraram a atividade antibacteriana de OEs de diversas espécies de plantas aromáticas, sendo também abordada a ação dos componentes majoritários usados de forma isolada. Porém, em alguns dos casos, é levantada e analisada a questão de como os componentes minoritários podem atuar em combinação com os majoritários, levando assim ao sinergismo e potencialização do efeito antibacteriano. Além disso, há a defesa de que os OEs podem ser usados de forma complementar aos tratamentos convencionais.

Um dos OEs amplamente testados e descrito como possuidor de atividade antibacteriana é o de orégano (MUTLU-INGOK, 2020). No trabalho de CUI *et al.* (2019), foi investigado o seu possível mecanismo de ação contra uma cepa de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA), no qual foi observado que a bactéria sofreu com danos irreversíveis na membrana celular com vazamento de moléculas como Na⁺ e K⁺, alteração no metabolismo respiratório e alteração no material genético pela intercalação do carvacrol, composto majoritário do OE de

orégano, no seu DNA. Além disso ocorreu a inibição da produção da toxina PVL pelo microrganismo.

Já relacionado ao possível sinergismo de diferentes OEs, no trabalho de Mutlu-Ingkok (2020) foram testados os efeitos dos OEs de cominho, cardamomo e erva-doce de forma individual e combinada contra as cepas bacterianas de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* a partir do método de microdiluição em caldo. Foi observado que os três OEs demonstraram efeito antibacteriano, independente da classificação da bactéria em gram-negativa ou positiva, demonstrando o maior efeito contra *C. coli* e *C. jejuni*, além disso foi constatado que a combinação dos três OEs resultou em maior atividade antibacteriana, demonstrando a existência de sinergismo entre eles.

Também avaliando o efeito sinérgico de OEs, mas dessa vez com drogas antibacterianas, o trabalho de Duarte *et al.* (2012) demonstrou que, pelo método de microdiluição em caldo, o OE de *Coriandrum sativum* L. apresentou e intensificou o efeito antibacteriano de quatro das seis drogas testadas, sendo elas o cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina e a tetraciclina.

3.2.4 Atividade antifúngica

Nesse caso o efeito OEs também se relaciona aos danos causados na membrana citoplasmática uma vez que pode levar ao vazamento de materiais celulares e à sua separação da parede celular, estrutura que também é considerada um alvo no tratamento de infecções fúngicas (MUTLU-INGOK *et al.* 2020).

Porém, de acordo com as revisões de Chouhan, Sharma, e Guleria (2017) e de Nazzaro *et al.* (2017), os OEs podem levar à: alteração e/ou inibição da polimerização da quitina, envolvida na formação de septos e na maturação dos fungos, atrapalhando dessa forma, a divisão celular e crescimento; disfunção mitocondrial pela alteração na funcionabilidade das desidrogenases (lactato, malato e succinato desidrogenase); alteração do efluxo celular por influência na ação H⁺-ATPase alterando o gradiente eletroquímico, o pH intracelular e diminuindo a resistência à outras drogas, uma vez que estes não estarão sendo retirados das células e, por fim, a inibição da biossíntese de ergosterol, essencial para controle osmótico e metabólico.

Segundo a revisão realizada por Mutlu-Ingok *et al.* (2020) há consideravelmente menos estudos avaliando a ação antifúngica dos OEs quando comparados com os antibacterianos, além disso os mecanismos de ação são menos descritos. Ademais os autores destacam que existem ainda menos relatos das atividades contra a produção de micotoxinas pelos fungos, substâncias que apresentam risco para a saúde humana pela sua toxicidade e pelo seu potencial cancerígeno.

Um dos OEs que mais apresenta relatos de atividade antifúngica é o de *Rosmarinus officinalis* L (alecrim), como no caso do trabalho de Da Silva e Bomfim *et al.* (2019), no qual o OE da planta demonstrou efeito de redução do crescimento de *Aspergillus flavus*, atribuído principalmente a ação do óleo sobre a biossíntese de ergosterol. Além disso os autores investigaram a ação do OE de alecrim sobre a produção de micotoxinas, e foi observado redução da produção das aflatoxinas AFB1 e AFB2, efeito atribuído à influência na produção de carboidratos e à interferência na via metabólica de produção das aflatoxinas.

Trabalhando com a mesma espécie de fungo, Prakash *et al.* (2014) observaram que o OE de *Boswellia carterii* também apresentou efeito inibitório no crescimento do microrganismo de forma dose dependente, isso relacionado à redução de produção de ergosterol, além de terem descrito que o OE inibiu a produção de aflatoxinas de forma mais eficaz do que suprimindo o crescimento do fungo, ou seja, a concentração do OE para suprimir a produção da toxina foi menor do que a necessária para inibir o crescimento do fungo.

Já em relação aos efeitos sinérgicos dos OEs o trabalho de Hossain *et al.* (2016) demonstrou que a combinação dos óleos de *Thymus vulgaris* (tomilho) e de *Origanum vulgare* (orégano) resultou em um efeito antifúngico mais eficaz do que quando utilizados individualmente, sendo que tal ocorrência foi observada nas quatro cepas diferentes testadas: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium chrysogenum*. O OE de tomilho também se destaca por apresentar efeito sinérgico com drogas antifúngicas, conforme relatado no estudo de Jafri e Ahmad (2020), no qual, combinado com o fuconazol, o OE reduziu a formação de hifas e a produção de biofilme das cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

3.3 ESTUDOS COM A FASE VAPOR DOS OES

Muitos dos efeitos dos OEs são estudados se empregando apenas sua fase líquida, não se levando em consideração a potencial influência dos compostos voláteis no desfecho final. Isso é observado principalmente nos casos em que a metodologia busca desenvolver modelos fisiológicos humanos, como em estudos de efeito antitumorais e antioxidantes, tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Dessa forma se destaca o trabalho de SEAL *et al.* (2012) o qual se diferencia dos trabalhos citados anteriormente pelo uso da fase vapor, e não líquida, de OEs. Aqui os autores relatam que o tratamento com OE da semente de *Litsea cubeba*, em células tumorais de pulmão (linhagem A549), levou à indução da apoptose por diferentes mecanismos como: a desfosforilação de Akt, que, em uma reação em cascata, levou à liberação mitocondrial do citocromo c com a consequente ativação das caspases 9 e 3; a desativação de Mdm2, levando ao aumento de p53 e da expressão de p21, a qual, ao se ligar com a ciclina D1, gerou à parada do ciclo celular da fase G1 para a fase S.

Com base em resultados do grupo, frente ao uso da fase vapor dos OEs como potencial antitumoral, há o trabalho de JUSTUS *et al.* (2015) no qual a fase vapor do OE de *Lavandula dentata* L. demonstrou citotoxicidade contra a linhagem celular Calu-3 de forma tempo e dose dependente. As células demonstraram a morte celular tanto pela via necrótica quanto apoptótica, porém a primeira se apresentou de forma dominante, com CIV₅₀ estimado de 750 µg/mL, promovendo também a parada do ciclo celular na fase G0/G1. Utilizando a mesma linhagem celular Tozetto (2016) avaliou a citotoxicidade do OE de *Thymus vulgaris* (tomilho) se verificando redução da viabilidade celular com um CIV₅₀ de 260,30 ± 10,08 µg/mL no ensaio de MTT e 223,03 ± 9,39 µg/mL no ensaio de SRB.

Em relação ao efeito antioxidante da fase vapor de OEs dados do grupo, como os obtidos por Verde (2021) demonstraram, pelos métodos de sequestro de radical livres DPPH e ABTS, que o vapor do OE de cravo (*Eugenia caryophyllus*) apresentou alta atividade antioxidante, seguido pelos óleos de olíbano (*Boswellia carterii*), zimbro (*Juniperus communis* L.), e Artemísia (*Artemisia vulgaris*). Já BIAVATTI (2022), avaliou o efeito antioxidante do OE comercial de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) no qual pelos métodos de DPPH, ABTS foi observado que o OE se

apresentou efetivo no sequestro dos radicais e pelo método FRAP, no qual o óleo também apresentou bom potencial reducional. Além disso a autora aborda que pelo método de DCFH-DA foi constatado que o OE de cravo da Índia não reduziu a produção de EROs induzida pelo peróxido de hidrogênio, mas demonstrou efeito sinérgico em ensaios com o H₂O₂. Com exceção desses dados, na literatura, até agora, não há trabalhos que abordem o efeito antioxidante da fase vapor de OEs.

No que diz respeito ao efeito antimicrobiano de OEs na fase vapor, há um número maior de estudos que o avaliam dessa forma. Isso se relaciona ao interesse da indústria alimentícia em buscar compostos que protejam e conservem alimentos de bactérias e fungos de forma eficiente, mas que ao mesmo tempo não apresentem efeitos colaterais e tóxicos à saúde humana. Assim uma das alternativas viáveis seria o uso da fase vapor dos OEs, uma vez que se utilizando de sua fase líquida seria necessária uma quantidade maior dele, o que poderia levar também a alteração no sabor do alimento (BHAVANIRAMYA, *et al.*, 2019; REYES-JURADO, 2020).

Porém, nem todos os dados da literatura estão relacionados somente à preservação de alimentos. Nadjib *et al.* (2014) avaliaram as fases líquidas e vapor do OE de *Eucalyptus globulus* sobre diferentes patógenos do sistema respiratório humano, no qual os resultados para cada uma das fases se diferenciaram. O OE na fase líquida demonstrou um efeito inibitório maior nas bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) do que nas negativas (*Enterobacter sp* e *Escherichia coli*) enquanto que na fase vapor as cepas de *A. baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* se apresentaram mais susceptíveis aos efeitos do OE em baixas concentrações na fase vapor de forma dose dependente, demonstrando um potencial uso do vapor do OE como adjuvante no tratamento e/ou prevenção de doenças respiratórias.

3.4 ZIMBRO (*Junipeus communis* L.)

Pertencente à família Cupressaceae, essa gimnosperma possui distribuição cosmopolita, sendo mais abundante em áreas boreais e em regiões montanhosas da Europa. O zimbro, indicado na Figura 3, é uma planta de porte pequeno ou médio, se apresentando de forma geralmente arbustiva, suas folhas são em formato de agulha e apresentam falsos frutos, de forma pequena e arredondada, chamados de bagas,

que apresentam coloração púrpura escura e azulada (BAIS *et al.*, 2014; BACÉM, 2018).

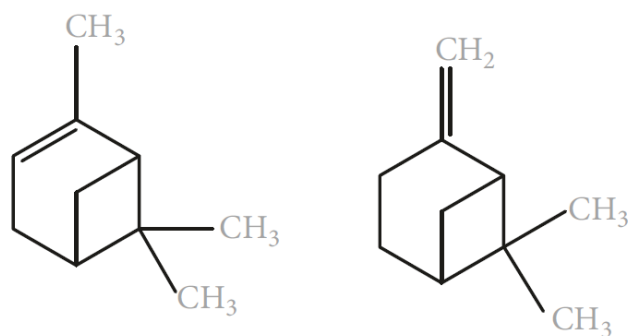
Figura 3 - *Juniperus communis* L.



Fonte: BAIS, *et al.* (2014).

Todas as espécies de zimbro possuem alto teor de óleo essencial, que podem ser extraídos de diferentes partes da planta, sendo obtidos geralmente das bagas e das folhas. Seu OE se caracteriza pelas altas concentrações de sesquiterpenos, diterpenos e monoterpenos de hidrocarbonetos, sendo que geralmente seu perfil fitoquímico apresenta como compostos majoritários o α -pineno e o β -pineno, apresentados na Figura 4, além do sabineno, limoneno, e β -mirceno (RAINA *et al.*, 2019; XAVIER *et al.* 2021).

Figura 4 – Estrutura química do α -pineno e do β -pineno, compostos majoritários do OE utilizado.



Fonte: BLOWMAN (2018).

Essas plantas são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica e alimentícia como aromatizantes, mas também na produção de bebidas alcoólicas, como o gim, e como condimento alimentar. Além disso o *J. communis* L. vem sendo utilizado na medicina tradicional para os mais diversos fins, como para o tratamento de desordens ginecológicas e digestivas, doenças inflamatórias, resfriados e problemas respiratórios como tosse, bronquite e asma. Diversos estudos vêm

demonstrando que o zimbro possui importantes propriedades farmacológicas, como a antioxidante, diurética, antiinflamatória, neuro e hepatoprotetiva, antifúngica, antibacteriana e antidiabética (VASILJIJEVIĆ *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.* 2022).

3.4.1 Atividades biológicas do zimbro e de seu OE

O OE de *Juniperus communis* L. teve sua atividade antitumoral e antioxidante avaliada nos estudos de Vasilijević *et al.*, (2018), no qual, a partir dos ensaios de DPPH e TBA, foi demonstrado que o óleo apresentou atividade antioxidante, porém mais baixa do que a apresentada pelo composto controle, o BHT. Além disso, o OE, nesse mesmo trabalho, apresentou atividade antitumoral contra a linhagem de carcinoma de pulmão A549 e baixa citotoxicidade na linhagem celular controle MRC5. Quando o OE foi testado em combinação com a doxorubicina, uma droga antitumoral, ocorreu o sinergismo no efeito de redução de viabilidade das células tumorais.

Contrapondo os resultados do efeito antioxidante citados anteriormente, o estudo realizado por Ramadan *et al.* (2015) demonstrou que o OE de zimbro exibiu uma alta atividade antioxidante comparada com o controle, TBHQ, em ensaios de DPPH, porém na avaliação de citotoxicidade, pelo método de MTT contra as três linhagens celulares tumorais HepG2, MCF-7 e A549 o óleo essencial de zimbro também demonstrou potencial ação antitumoral com valores de IC_{50} inferiores ao da doxorubicina.

Já em um estudo utilizando modelos *in vivo*, Gumral *et al.* (2013) compararam o estresse oxidativo e a produção de enzimas antioxidantes em ratos machos adultos da raça Wistar, que estavam sendo submetidos à uma dieta rica em colesterol com os grupos que recebiam a mesma dieta, mas combinada com diferentes concentrações de OE de zimbro. Pela análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e das enzimas SOD, GSH-Px e CAT, foi demonstrado que nas dietas com as maiores concentrações do OE os ratos apresentaram a redução dos produtos advindos da peroxidação lipídica e aumento das enzimas antioxidantes, ou seja, houve aumento de atividade antioxidante e redução do estresse oxidativo.

Em relação aos efeitos antimicrobianos o trabalho de Peruc *et al.* (2019) avaliou a ação do OE de zimbro sobre cepas de *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*, microrganismos oportunistas, e, como resultado foi

observado que o óleo inibiu as formações de biofilme e a adesão de ambas as cepas. Ao analisar a sua morfologia, pela microscopia eletrônica de transmissão, foi constatado que houve dano na parede celular com separação e vazamento do citoplasma e de outros conteúdos celulares. Já no trabalho de Cabral *et al.* (2012) o OE de zimbro apresentou forte efeito contra os fungos *Microsporium canis* e *Trichophyton rubrum* com o valor de CIM (concentração inibitória mínima) e CLM (concentração letal mínima) de 0,32 $\mu\text{L/mL}$.

3.4.2 Atividades biológicas dos compostos majoritários do OE de zimbro

Muitas das atividades farmacológicas do OE de *Juniperus communis* L. são associadas aos seus componentes majoritários. Destes o α -pineno, que na maioria das subespécies se apresenta em maior concentração, já exibiu efeitos citotóxicos na linhagem B16F10 (melanoma) induzidos pela despolarização da membrana mitocondrial, produção de EROs, aumento da atividade da caspase-3 e fragmentação do DNA (MATSUO *et al.* 2011). Além disso, nesse mesmo trabalho, usando um modelo *in vivo*, os autores relataram que o α -pineno foi antimetastático reduzindo o número de nódulos tumorais do melanoma nos camundongos C57BL/6.

O α -pineno e β -pineno também demonstraram efeito citotóxico contra duas linhagens celulares tumorais escamosas de língua SCC9 e SCC25 nos ensaios realizados por Machado *et al.* (2021) no qual, respectivamente para cada linhagem, o β -pineno apresentou um CIL_{50} de 71,03 e 67,26 e o α -pineno um CIL_{50} de 103,8 e 104,9, sendo que ambos os compostos apresentam maior seletividade para as linhagens tumorais ($\text{IS} = 1,44$), porém esse está abaixo do valor indicado na literatura como o adequado para o emprego de um composto com potencial promissor para antitumoral ($\text{IS} = 2,0$).

O α -pineno também demonstrou efeito antioxidante na linhagem celular PC12, em ensaios utilizando o método de DCFH-DA, o composto inibiu a produção intracelular de ROS, sendo observado o aumentando a expressão das enzimas antioxidantes, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e hemeoxigenase 1 (HO-1) (PORRES-MARTÍNEZ *et al.*, 2016).

Em relação ao efeito antimicrobiano, o estudo realizado por Wang *et al.* (2012) demonstrou que o α -pineno e β -pineno possuíram efeito bactericida contra cinco cepas, sendo elas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, porém os valores de concentração inibitória e bactericida mínima foram menores do que o da estreptomicina. o α -pineno também já demonstrou moderado efeito antifúngico contra duas cepas de *Candida* (*C. parapsilosis* and *C. tropicalis*) isoladas de pacientes e efeito sinérgico ao ser associado com ácido bórico (NOBREGA *et al.* 2020).

Face ao exposto, é possível inferir que tanto o OE de *J. communis* L. quanto seus compostos majoritários., quer na fase líquida ou vapor, devido aos seus efeitos relatados, antitumoral, antioxidante e antimicrobiano, tornam-se interessantes para o uso no combate das doenças do sistema respiratório. Somado ao fato de que essa inerente propriedade, a volatilidade, poderia ser vantajosa pensando-se no emprego por via inalatória. Via em que os compostos poderiam ser entregues diretamente aos tecidos do trato respiratório-pulmonar. Assim os estudos do OE de zimbro, de forma comparativa entre as fases líquidas e vapor, de maneira preliminar poderá respaldar a indicação desta via de administração.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de zimbro foi adquirido da empresa Ferquima Indústria e Comércio LTDA, cuja composição química relatada pelo fornecedor está apresentada no Quadro 3. A densidade do OE foi calculada pela fórmula ($D=m(g) / v (mL)$) e esse foi solubilizado em solução veículo contendo propilenoglicol e álcool etílico PA na proporção 25:75, para posterior obtenção das diferentes concentrações por diluições com salina (NaCl 0,9%).

Quadro 3 - Composição do OE de zimbro adquirido

Principais Componentes	α -pineno: 63%, β -pineno: 11%, Mirceno: 5% Limoneno: 4% Sabineno: 2% Cariofileno: 2%
Densidade (20°C)	0,850 – 0,872
Impurezas	Isento
Extração	Destilação a vapor do arbusto, bagas
Odor	Fresco, Amadeirado Doce

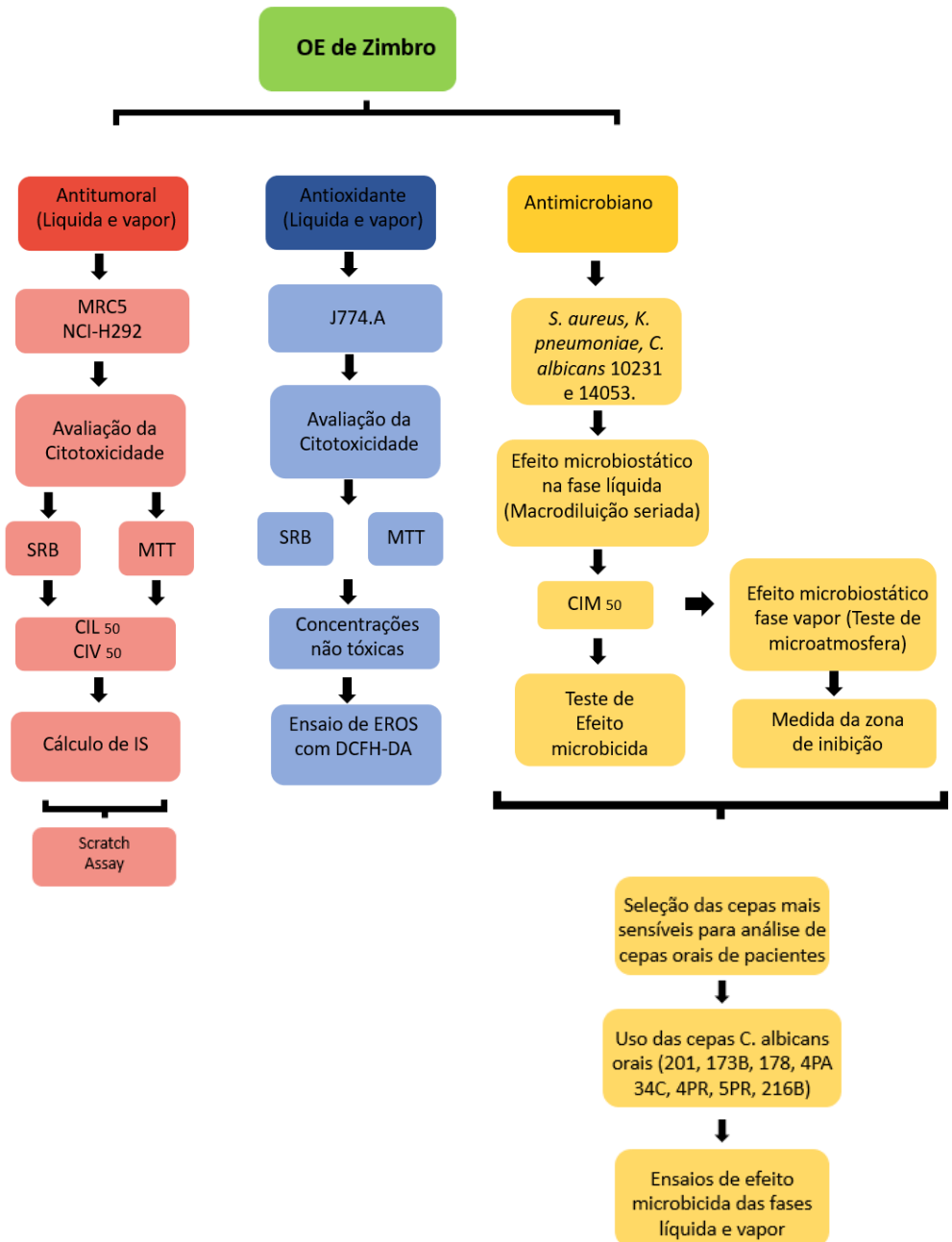
Fonte: Ferquima Indústria e Comércio Ltda, 2023.

Para confirmação da composição química do OE foi realizado uma cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas (CG/EM) utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu modelo GC-2010 Plus, acoplado a detector de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040 e injetor automático modelo AOC-5000 Plus.

A amostra do OE foi diluída a 1% (v/v) em hexano e analisada utilizando as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida SLB-5MS (5% difenil + 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O gás de arraste empregado foi o hélio com vazão de 1,02 mL min⁻¹, em modo split 1:90, estando o injetor à 250 °C e o sistema de ionização 70 eV. Foi injetado 1 μ L de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60 °C (0') até 250°C, com aquecimento de 3 °C min⁻¹. Para o cálculo do índice aritmético foi empregada uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados, C8 a C19.

A estratégia experimental para a triagem de atividades biológicas foi planejada e executada, conforme resumido na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da triagem de atividades biológicas do OE de zimbro.



Fonte: O autor, 2023.

4.2 LINHAGENS CELULARES, CONDIÇÕES DE CULTIVO E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A linhagem MRC-5 (ATCC- CCL-171), fibroblastos de pulmão humano, foi adquirida do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz. As células foram

cultivadas em meio MEM, pH 7,4, suplementado com 15% (v/v) de soro fetal bovino (SFB - Gibco), 2mM de L-glutamina (Vetec), 1mM de piruvato de sódio (Sigma Aldrich), 2g/L de bicarbonato de sódio (Vetec) e 1 mL/L de antibiótico penicilina e estreptomicina - 100 U/mL e 10 mg/mL, respectivamente (Sigma Aldrich).

A linhagem NCI-H292 (ATCC CRL-1848), de células de carcinoma pulmonar mucoepidermoide, foi adquirida do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz e foi cultivada em meio RPMI-1640 (Gibco) contendo 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de SFB e 1 mL/L de antibiótico (penicilina e estreptomicina - 100 µ/mL e 10 mg/mL, respectivamente).

Já a linhagem J774.A (ATCC-TIB-67) foi cedida pelo grupo de pesquisadores do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, através da colaboração com a Dr^a Thais Lima. A linhagem foi cultivada em meio DMEM (Gibco) contendo 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de SFB e 1 mL/L de antibiótico (penicilina e estreptomicina - 100 µ/mL e 10 mg/mL, respectivamente).

Todas as culturas celulares foram mantidas em uma incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%.

Para a avaliação da viabilidade celular das diferentes linhagens, foram utilizados os métodos de redução de MTT e de coloração com SRB. O primeiro demonstra a citotoxicidade a partir da avaliação da função mitocondrial da célula referente a atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais, enquanto que o segundo permite avaliar a viabilidade a partir da quantificação dos componentes proteicos das células aos quais o corante se ligou (BOCHNIE; GREGÓRIO; MACIEL, 2016).

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE LÍQUIDA DO OE DE ZIMBRO

O efeito do OE na fase líquida foi avaliado por meio da determinação da viabilidade das células tratadas com diferentes concentrações do OE. As células foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços na concentração de 0,1 X 10⁴ células por poço/100 µL e incubadas por 24 horas para que ocorresse total adesão

celular. Após esse período foram adicionados em cada poço 100 µL do OE diluídos em meio de cultivo, com as concentrações do OE variando de 5 a 2000 µg/mL.

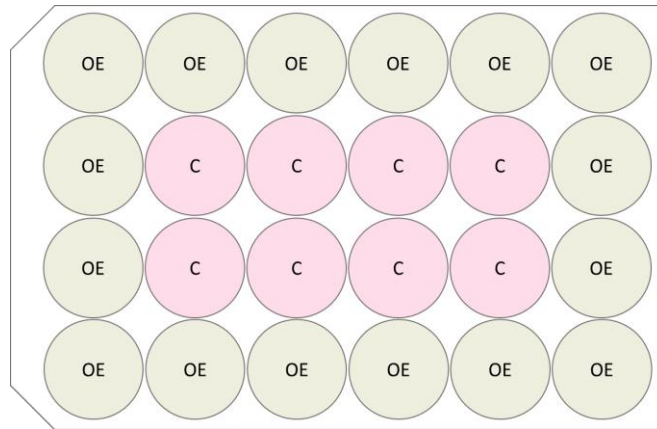
O controle foi semeado em uma placa de 96 poços separada, nela, o meio de cultivo foi associado à solução veículo, para que a mesma apresentasse a mesma concentração adicionada na outra placa, sendo também adicionado 100 µL da solução em cada poço.

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO OE DE ZIMBRO

Para avaliar o efeito dos compostos voláteis do OE de Zimbro sobre as linhagens celulares, foi utilizada a estratégia metodológica descrita por Seal *et al.* (2012), com modificações. As células foram semeadas na concentração de 1×10^4 células por poço/1000 µL nos 8 poços centrais de placas de 24 poços, as quais foram mantidas, por 24h, para que ocorresse total adesão celular. Nos 16 poços desprovidos de células foram adicionados 1000 µL do OE diluídos em solução salina (NaCl 0,9%) em diferentes concentrações (25 - 16000 por µg/mL/poço) em diferentes placas, como demonstrado na Figura 6.

A placa controle dos experimentos com o OE recebeu a solução salina 0,9% associada a uma solução complementar (veículo + salina na mesma proporção da solução estoque) para ficar com a mesma concentração da solução veículo adicionada nas demais placas. Depois disso as placas foram incubadas pelo período de 24 horas para a determinação da viabilidade celular das culturas.

Figura 6 - Ilustração da estratégia de semeadura utilizada para avaliar o efeito da fase vapor do OE de zimbro.



Em (C) poços contendo células; em (OE) poços contendo o óleo essencial de zimbro. Dimensões da placa (L x A): 127,5 x 22,45 mm
 Fonte: O autor, 2023.

4.4.1 Ensaio de redução de MTT

O ensaio de redução de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) é um ensaio colorimétrico de reação de redução química deste composto para a avaliação da viabilidade celular. Em resumo, o meio de cultivo foi descartado e 200 μ L de MTT foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada a 37°C, por um período de 2 horas. A solução de MTT foi descartada e os cristais de formazan formados, de coloração violeta formados pela ação das mitocôndrias, foram solubilizados em 200 μ L de DMSO. A determinação quantitativa da viabilidade celular foi realizada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm no leitor de microplacas de multidetecção híbrida Synergy™H1, com software Gen5.2, no laboratório multiusuário - LABMU/SEBISA da UEPG. (MOSMANN, 1983).

4.4.2 Ensaio de coloração de proteínas

Para tal ensaio utilizou-se o reagente sulforodamina B (SRB). Esse ensaio de determinação de viabilidade celular é colorimétrico e o reagente SRB cora as proteínas das células aderidas nos poços das placas de culturas. Em resumo, decorrido o período de incubação o meio de cultura foi removido. Os poços foram

lavados com tampão fosfato (pH 7,4), 100 µL de ácido tricloroacético 10% foram adicionados aos mesmos, sendo as placas mantidas sob refrigeração por 30 minutos. Em seguida, os poços foram lavados com água destilada e as placas foram deixadas em temperatura ambiente para secagem. Uma vez secas adicionou-se 100 µL/poço de solução de SRB 0,4%. Após o período de 30 minutos, para remover o excesso de corante, as placas foram lavadas com uma solução de ácido acético 1% e secas em temperatura ambiente. Por fim, para solubilização, 150 µL de TrisBase 10 mM foi adicionada (PAPAZISIS *et al.*, 1997). A leitura da absorbância foi realizada nos comprimentos de 520 nm e 620 nm. Para a normalização dos dados, a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada a subtração do valor da segunda leitura pela da primeira.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos por, no mínimo, três vezes. Para ambos os ensaios, a viabilidade celular foi calculada em porcentagem de células viáveis pela seguinte equação:

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

4.4.3 Determinação dos valores de CIL50 - fase líquida, CIV50 - fase vapor e índice de seletividade do OE de Zimbro

A concentração do OE de Zimbro, em fase líquida, capaz de gerar redução da viabilidade celular em 50% (CIL₅₀) e concentração do OE de Zimbro, em fase líquida, capaz de gerar vapor que reduz a viabilidade celular em 50% (CIV₅₀) expressa em µg/mL/poço, foram calculadas por meio de regressão não linear no Software GraphPad Prism 5.01 para cada linhagem celular.

Para avaliar a seletividade do OE de zimbro em sua fase líquida e vapor, a linhagem MRC-5 foi utilizada como uma linhagem de controle. O índice de seletividade (IS) foi calculado da razão do valor de CIL₅₀ ou CIV₅₀ da linhagem tumoral pelo valor da CIL₅₀ ou CIV₅₀ da linhagem normal, sendo que a obtenção de valores menores que 2 referem-se à seletividade não-específica (AYESH; ABED; FARIS, 2014).

$$IS = \frac{CIV_{50} \text{ células tumorais}}{CIV_{50} \text{ células não tumorais}} \times 100 \text{ ou } IS = \frac{CIL_{50} \text{ células tumorais}}{CIL_{50} \text{ células não tumorais}} \times 100$$

4.4.4 Ensaio de avaliação de migração celular (*Scratch Assay*) por meio do emprego do corante Rosenfeld

O método de *Scratch* se baseia na observação do crescimento de células em uma monocamada após a formação de uma lacuna no centro da superfície à qual elas estão aderidas até a formação de contatos célula-célula (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

As células, para os ensaios da fase líquida e vapor, foram semeadas nos 8 poços centrais de placas de 24 poços na concentração de 4×10^5 e incubadas pelo período de 24 h para atingirem a confluência. Após esse período as placas foram riscadas com uma ponteira em uma única direção passando pelo centro de cada um dos poços. Para a retirada do excesso de conteúdo celular, o meio de cultivo foi retirado e os poços foram lavados com 200 μL de PBS estéril. Em seguida o meio foi recolocado sobre as células, no caso dos ensaios com fase líquida o meio continha o OE na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e dos ensaios com a fase vapor o meio foi recolocado sendo adicionado aos poços adjacentes o OE diluído em salina na concentração de 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Após o período de 24 h o sobrenadante foi retirado para a adição de 200 μL de corante de Rosenfeld sobre as células pelo período de 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se 400 μL de água destilada fervida por 8 minutos. Para retirar o excesso do corante de Rosenfeld, placas foram lavadas com água corrente. Para a secagem das mesmas elas foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período a proliferação e migração celular foi visualizada por meio do microscópio Olympus.

Posteriormente a taxa de migração celular foi avaliada empregando-se a análise das imagens fotográficas pelo software ImageJ 1.51s (National Institutes of Health, Maryland, EUA). A taxa de migração celular foi determinada pela medição da área de crescimento celular após a realização do risco na placa e adição do tratamento, a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ crescimento} = \frac{\text{área período 0 média} - \text{área período 24h média}}{\text{área período 0 média}} \times 100$$

4.5 DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE EROS EM CÉLULAS J774.A SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM O OE DE ZIMBRO EM FASE LIQUIDA OU VAPOR

O ensaio utilizando o marcador 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) em ensaios fluorimétricos se torna executável em estudos celulares pela facilidade do marcador permear a membrana da célula possibilitando a detecção da fluorescência no decorrer do processo de oxidação do marcador (LAUTRAITE, *et al.*, 2003). No interior da célula, esterases hidrolisam o DCFH-DA o que o leva a adquirir a sua forma não fluorescente denominada DCFH, em seguida a presença de peroxidases leva à oxidação do DCFH em DCF, sua forma fluorescente (AULA, *et al.*, 2015).

Por meio da adaptação da metodologia proposta por Rocha e Leitão (2018), as células foram cultivadas em placas de 24 poços (vapor e líquida), na concentração de 5×10^4 cél/mL/poço e incubadas a 37°C por 24 horas, para total adesão celular. Após este período, o OE foi adicionado seguindo a mesma metodologia descrita nos itens 4.3 e 4.4. Depois do período de tratamento, foi feita a retirada do meio de cultura, os poços foram lavados com PBS sendo em seguida adicionado 200 µL da solução do marcador DCFH-DA (2% de DCFH-DA em meio de cultivo incolor suplementado com 10% de SFB) em cada poço nas placas de 24 poços e 100 µL nas placas de 96 poços. Após 35 minutos de incubação a solução foi retirada, os poços foram lavados com PBS, e na sequência, adicionou-se 250 µL de peróxido de hidrogênio nas concentrações de 250 µM em metade dos poços com o conteúdo celular. Imediatamente o conteúdo das placas foram repassados para uma placa preta de 96 poços para a quantificação da fluorescência, medida em fluorímetro Biotek Synergy HT utilizando 485 nm e 525 nm emissão: excitação, respectivamente.

4.6 CEPAS BACTERIANAS E FÚNGICAS

As cepas utilizadas foram cedidas pelo Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os microrganismos testados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC® 13883), *Candida albicans* (ATCC® 10231) e *Candida albicans* (ATCC® 14053). Foram selecionadas duas cepas de *C. albicans* devido a diferente resistência apresentada

por ambas em ensaios de avaliação de atividade antifúngica. As culturas foram repicadas 24 horas antes da realização dos testes em placa de Ágar Sangue e incubadas à 35°C.

Também foram utilizadas de cepas de *C. albicans* spp. isoladas do biofilme subgingival e saliva de pacientes que procuraram atendimento odontológico nas clínicas de odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) e da Aprovação comitê de ética – Parecer nº131.824 (Anexo B). As cepas foram identificadas como 201, 173B, 178, 4PA, 34C, 4PR, 5PR e 216B, as quais foram submetidas aos mesmos tratamentos e condições que as *C. albicans* ATCC.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA POR MACRODILUIÇÃO EM CALDO

Para a avaliação dos efeitos da fase líquida sobre as cepas bacterianas e fúngicas testadas, foi realizado o teste da CIM por macrodiluição em caldo Muller-Hinton, adaptado Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), em tubos com volume final de 1,0 mL. Inicialmente, foi preparada uma solução mãe com o óleo essencial, caldo Muller-Hinton com Tween 80 a 2%, posteriormente diluído em caldo Muller-Hinton. Para as cepas de fungo a única diferença foi a utilização do caldo Muller-Hinton com 2% de glicose. Dessa solução mãe, foram feitas diluições seriadas, com as concentrações finais testadas de: 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,2 µg/mL. Em frascos de vidro de 4 mL foi adicionado 1mL do caldo suplementado ou não com 2% de glicose, 1 mL da solução mãe e 50 µL da suspensão padrão de microrganismos em 0,5 da escala de MacFarland, diluída em salina na proporção de 1:10.

Os testes foram feitos em triplicata, com controles de crescimento do microrganismo sem a presença do OE e com um controle em branco somente com o caldo de cultivo. Além disso um terceiro controle em branco, apenas com as diferentes concentrações do OE, foi preparado. Após período de incubação de 24 horas à 35°C foram transferidos 200 µl dos frascos para uma placa de 96 poços para a realização de leituras da densidade óptica (DO) a 630 nm no leitor de microplacas, sendo realizadas 3 réplicas biológicas e, para cada uma das réplicas, 3 repetições de leitura.

O percentual de inibição foi proporcionalmente calculado com base no crescimento dos microrganismos sem a presença do óleo essencial, equivalente a 100%. Os valores do controle branco com os OEs foram descontados da leitura da DO de forma correspondente em cada concentração testada, conforme indicado pela seguinte equação:

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

A atividade inibitória foi calculada a partir da diferença entre a taxa do crescimento dos testes em relação aos controles. A CIM₉₀ foi designada para inibições do crescimento de ≥90% e CIM₅₀ para inibições ≥50 e <90%. Posteriormente, 1µl da suspensão presente em cada um dos quatro frascos que apresentaram inibição no crescimento (CIM₅₀) dos microrganismos testados e dos frascos controles com as concentrações correspondentes, foram passadas para uma (1) placa de Ágar sangue para, após o período de incubação de 24 horas à 35°C, ser realizada a leitura visual da atividade bacteriostática/fungistática ou da atividade bactericida/fungicida.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE MICROATMOSFERA

Após a obtenção dos valores de CIM₅₀ para cada um dos microrganismos testados realizou-se o ensaio de microatmosfera, adaptado de Burt *et al.* (2007) no qual as cepas dos microrganismos, em uma suspensão padrão de 0,5 da escala de MacFarland, diluída em salina na proporção de 1:10, foram semeadas por toda a superfície do Ágar Muller-Hinton disposto em uma placa de petri de dimensões de 90mm x 15mm. No centro de um filtro de papel em disco de 90mm estéril, foram aplicadas 50 µl das CIM₅₀ do OE de zimbro diluído em caldo Muller-Hinton com Tween 80 (com 2% de glicose para as cepas fúngicas e sem glicose para as bacterianas).

Além disso, foram preparadas placas controle somente com os filtros de papel e uma placa com o OE puro também no volume de 50 µl. Em seguida o filtro de papel foi colocado nas tampas das placas e estas foram imediatamente fechadas, envolvidas com papel filme e incubadas pelo período de 24 horas à 35°C com a tampa na posição inferior da placa e o inóculo na posição superior. Após o período de

incubação foi realizada a medição da zona de inibição de crescimento dos microrganismos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DE ZIMBRO POR MEIO DE CG/EM

Por meio da análise cromatográfica gasosa foram identificados como compostos majoritários o α -pineno e o β -pineno, nas porcentagens de 69,94% e de 11,95%, conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do OE de zimbro obtida por cromatografia gasosa

Composto	[] %
α -pineno	69,94
Canfeno	0,68
Sabineno	2,85
β -pineno	11,95
Mirceno	4,07
p-cimeno	1,32
Limoneno	3,75
Longifoleno	1,61
β -Cariofileno	3,83

Fonte: Laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química - UFPR, 2023.

No parecer técnico do OE comercial cedido pela empresa fornecedora do OE, o composto majoritário identificado foi o α -pineno, conforme apresentado no item 4.1 e Quadro 3. Apesar da pequena variação, que pode estar relacionada à diferentes condições de análise, o OE empregado neste estudo apresenta a composição conforme descrito na literatura (BAIS *et al.*, 2014; GONÇALVES *et al.*, 2022).

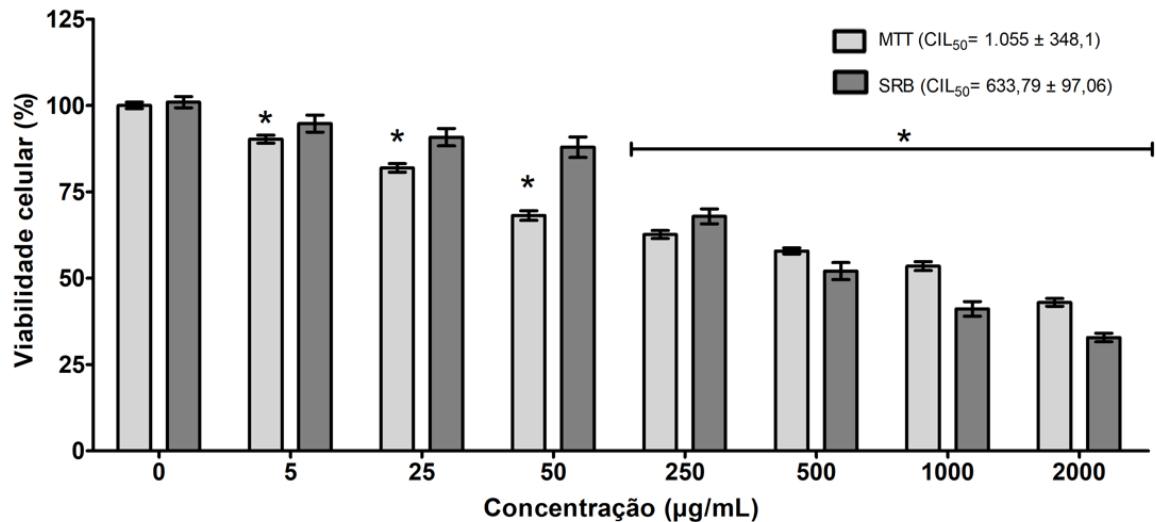
5.2 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS FASES LÍQUIDA E VAPOR DO OE DE ZIMBRO

5.2.1 Linhagem tumoral NCI-H292

Os efeitos obtidos da fase líquida do OE sobre a viabilidade celular da linhagem H292 estão expressos na Figura 7, sendo possível observar que houve

redução da viabilidade celular a partir da concentração de 5 µg/mL, tanto no ensaio de MTT(A) quanto no ensaio de SRB (B), tal redução se acentua conforme o aumento da concentração do OE, demonstrando, assim, um efeito dose dependente.

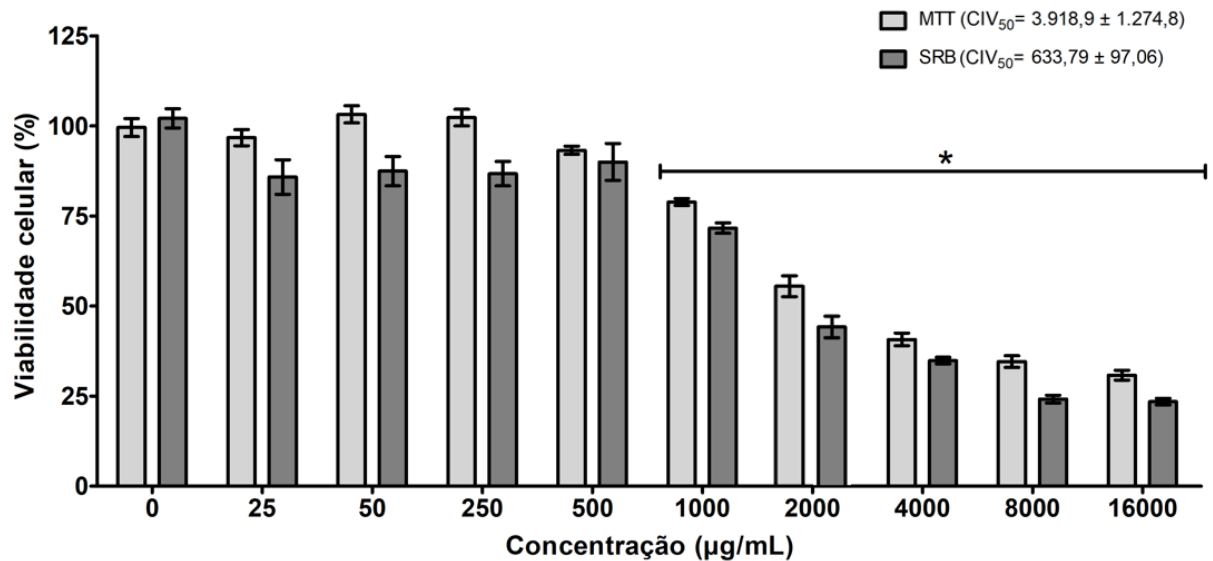
Figura 7 - Efeito da fase líquida do OE de zimbro em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem tumoral H292.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT e coloração por SRB após 24 horas de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com n=8 por ensaio. O símbolo * representa a diferença estatística em relação ao controle (etanol + P.A. + meio de cultivo) obtida por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Conforme demonstrado na Figura 8, nos ensaios utilizando a fase vapor do OE, as concentrações iniciais testadas não geraram efeito na redução da viabilidade celular, o que foi observado apenas a partir da concentração de 1000 µg/mL nos ensaios de MTT e SRB. Da mesma forma que nos experimentos com a fase líquida, a fase vapor levou a redução da viabilidade de forma dose dependente.

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



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

Para ambas as fases do OE utilizado, foi observado que, quando empregado o ensaio de SRB, os resultados apresentaram maior redução da viabilidade celular, quando comparado com os ensaios de MTT. Isso ocorrendo a partir da concentração de 1000 µg/mL

A partir dos resultados de viabilidade celular obtidos, calculou-se os valores da concentração do OE de zimbro, em fase líquida, capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (CIL₅₀) e da concentração em fase vapor, capaz de gerar vapor que reduz a viabilidade celular em 50% (CIV₅₀) expressa em µg/mL/poço no período de 24 h, os quais estão apresentados na Tabela 2.

Foi possível observar que as células tumorais apresentaram um valor menor de CIL₅₀ e de CIV₅₀ nos ensaios de SRB quando comparado com o ensaio de MTT.

Tabela 2 - Valores de CIL₅₀ CIV₅₀ para a linhagem tumoral H292 após tratamento com o OE de zimbro.

	CIL ₅₀		CIV ₅₀	
	MTT	SRB	MTT	SRB
24h	1.055 ± 348,1	633,79 ± 97,06	3.918,9 ± 1.274,8	1.843 ± 600,5

Os valores de CIL₅₀ e CIV₅₀ (µg/mL) são expressos como média ± desvio padrão, obtidos dos experimentos de 24h de tratamento com o OE de zimbro. Os valores foram calculados por regressão não linear pela análise de Probit e método de Finney no Software StatPlus Pro5.

O efeito antitumoral do OE de zimbro já foi avaliado anteriormente no estudo de Ramadan *et al.* (2015) no qual, dentre cinco linhagens tumorais testadas, o OE de zimbro na sua fase líquida apresentou citotoxicidade contra as células de carcinoma hepatocelular (HepG2), adenocarcinoma mamário (MCF-7), e adenocarcinoma de pulmão (A549) com os valores de CIL_{50} respectivos de $18,00 \pm 2,40 \mu\text{g/mL}$, $22,80 \pm 3,50 \mu\text{g/mL}$ e $21,75 \pm 4,80 \mu\text{g/mL}$.

Xavier *et al.* (2021) também demonstraram o efeito citotóxico da fase líquida OE de zimbro, extraído de plantas de duas localidades diferentes (Almazán e Barriomartíne). Os autores relataram maior redução da viabilidade e crescimento celulares para as linhagens tumorais de carcinoma mamário (MCF-7), carcinoma pulmonar (NCI-H460), adenocarcinoma colorretal (CaCo2) e carcinoma estomacal (AGS) quando comparado com as células controle, demonstrando, assim, alta seletividade do OE.

No trabalho citado anteriormente, a linhagem NCI-H460, que da mesma forma que a linhagem NCI-H292 utilizada neste trabalho, é do tipo de células não pequenas, apresentou os valores de GI_{50} de $44,87 \pm 3,42 \mu\text{g/mL}$ e de $41,99 \pm 3,60 \mu\text{g/mL}$. De maneira similar com o OE utilizado neste trabalho os autores revelaram que ambos os OEs também apresentaram o α -pineno como sendo seu composto majoritário, todavia em uma concentração menor (23,96% no OE de Almazán e 35,05% no OE de Barriomartíne).

Além dos estudos *in vitro*, Yaman *et al.* (2019) demonstraram os efeitos quimiopreventivos de uma alimentação suplementada com OE de zimbro em ratos submetidos à uma carcinogênese de cólon induzida. Os autores relataram uma redução numérica e dimensional nos adenomas e adenocarcinomas presentes nos tecidos dos ratos. Além disso, foi observado que no grupo tratado um aumento na expressão da caspase-3 e redução da produção de Ki-67, CEA e COX-2, além de melhorar o sistema de defesa antioxidante.

Na literatura, além do OE, encontram-se trabalhos com o extrato do zimbro como potencial antitumoral, no qual o composto majoritário, também é o α -pineno. No estudo de Gao *et al.* (2019), por exemplo, esse monoterpene estava presente em 34,87% da composição, os autores demonstraram que extrato aplicado em células B16/F10 (melanoma de camundongos) reduziu a proliferação celular de forma dose dependente, apresentando os valores de CIL_{50} de $27 \mu\text{g/mL}$ no período de 24h e de

44 µg/mL no período de 48 h. Foi relatada a parada do ciclo celular na fase G0/G1 das células, isso atribuído ao aumento da fosforilação das proteínas Rb, aumento da expressão de p53, p21 e das ciclinas A,B e D, todas envolvidas no processo da progressão do ciclo celular. Além disso, os ensaios de imunohistoquímica nos experimentos *in vivo* com camundongas fêmeas C57/BL6 indicaram que, no grupo tratado, o extrato apresentou efeito antiangiogênico e antimetástico, uma vez que reduziu os níveis de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, MMP2, e MMP9, proteínas consideradas mediadoras da angiogênese, proliferação e metástase tumoral.

O α -pineno e o β -pineno também geraram citotoxicidade sobre a linhagem tumoral de mama MCF-7. Na concentração de 50 µg/mL o α -pineno reduziu a viabilidade celular em 22,4% e o β -pineno não foi ativo, já na concentração de 100 µg/mL a redução da viabilidade foi de 35,8% para o α -pineno e de 98,8% para o β -pineno, indicando que este último possui alto potencial citotóxico quando utilizado em maiores concentrações (WRIGHT *et al.*, 2007). Cabe destacar que o β -pineno é o segundo composto em maior concentração no OE utilizado neste trabalho, sendo possível relacionar o efeito citotóxico do OE sobre as linhagens nas maiores concentrações.

No trabalho de ZHANG *et al.* (2015) a linhagens de carcinoma de pulmão A549 e NCI-H460 foram submetidas à tratamentos com o α -pineno e o β -pineno de forma isolada e combinada com Paclitaxel, um medicamento antitumoral. Como resultado os compostos apresentaram efeito sinérgico com a droga, aumentando a parada do ciclo celular na fase G0/G1 e levando à despolarização da membrana mitocondrial resultando em apoptose dessas células.

O efeito do α -pineno na parada do ciclo celular na fase G2/M da linhagem de carcinoma hepático (BEL-7402) foi relatado também por Chen (2015), no qual o composto levou a alteração nos níveis das proteínas envolvidas no ciclo celular com o aumento de Chk1, Chk2 e redução da ciclina B, CDC25 e CDK1. Quanto à citotoxicidade, o α -pineno, conforme estudo de Cole (2007) apresenta efeito próximo à da doxorrubicina, quando empregadas as linhagens de adenocarcinoma mamário (MCF-7), adenocarcinoma mamário (MDA-MB-468) e melanoma (UACC257).

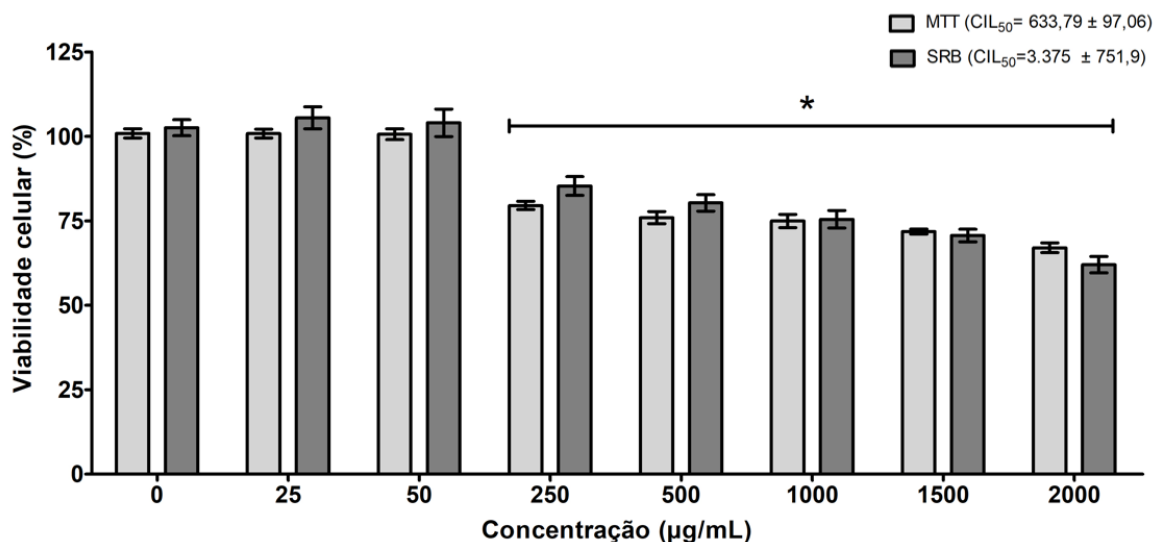
5.2.2 Determinação da seletividade da fase vapor e líquida do OE de zimbro

Para avaliar se o OE de zimbro induz morte celular de forma seletiva, a linhagem celular de fibroblastos de pulmão humanos MRC-5 também foi submetida aos tratamentos de 24 h para a determinação da viabilidade celular com MTT e SRB.

Conforme apresentado na Figura 9, a fase líquida do OE levou à redução da viabilidade celular de forma dose dependente a partir das concentrações de 250 µg/mL para ambos os ensaios de MTT e SRB. Assim como na linhagem tumoral, foi observada maior redução de viabilidade celular nos ensaios de SRB.

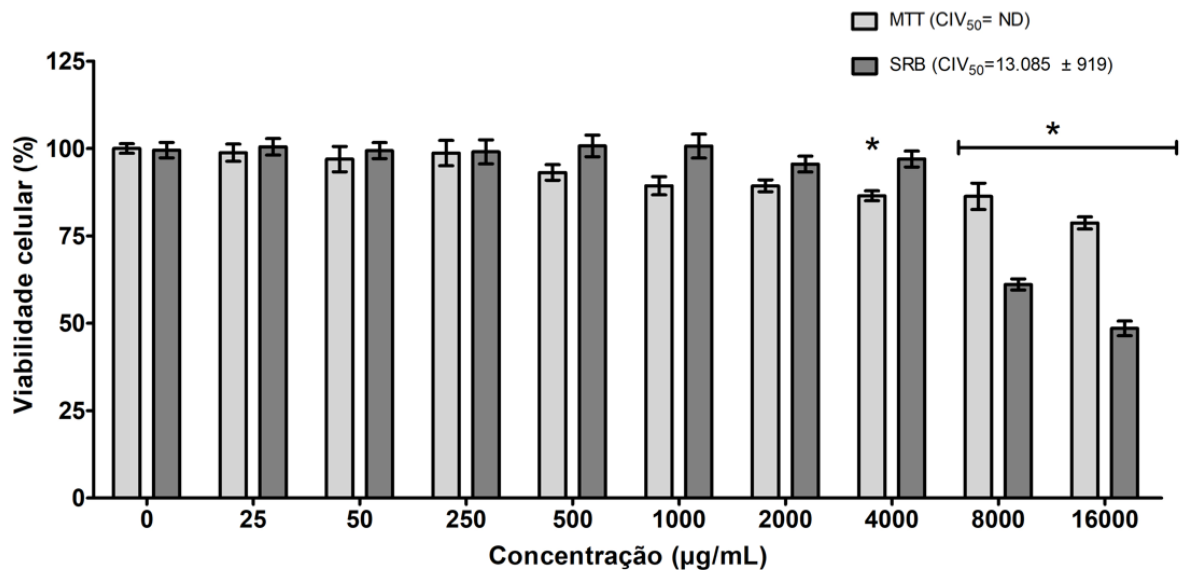
Nos ensaios com a fase vapor do OE de zimbro, o efeito de redução da viabilidade celular se deu a partir das concentrações de 4000 µg/mL, conforme apresentado na Figura 10. Porém no ensaio de MTT as maiores concentrações não chegaram ao valor de redução de 25% da viabilidade, diferente do que se observa nos ensaios de SRB, com a redução, além de ocorrer de forma dose dependente, revelou uma maior taxa de morte celular.

Figura 9 - Efeito da fase líquida do OE de zimbro em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem MRC-5.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT e coloração por SRB após 24 horas de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com n=8 por ensaio. O símbolo * representa a diferença estatística em relação ao controle (etanol + P.A. + meio de cultivo) obtida por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 10 - Efeito da fase vapor do OE de zimbro em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem MRC-5.



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

A partir dos valores obtidos dos ensaios com o OE foram calculados os valores de CIL_{50} e de CIV_{50} , os quais estão expressos em $\mu\text{g/mL/poço}$ no período de 24h e apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de CIL_{50} CIV_{50} para a linhagem MRC-5 após tratamento de 24h com o OE de zimbro.

	CIL_{50}		CIV_{50}	
	MTT	SRB	MTT	SRB
24h	$4.683 \pm 364,1$	$3.375 \pm 751,9$	nd	13.085 ± 919

Os valores de CIL_{50} e CIV_{50} ($\mu\text{g/mL}$) são expressos como média \pm desvio padrão, obtidos dos experimentos de 24h de tratamento com o OE de zimbro. Os valores foram calculados por regressão não linear pela análise de Probit e método de Finney no Software StatPlus Pro5. nd= não determinado devido à baixa citotoxicidade ($CIV_{50} > 2 \times 10^6 \mu\text{g/mL}$).

O valor do índice de seletividade (IS) é obtido pela razão entre o valor de CIL_{50} ou CIV_{50} da linhagem tumoral pelo valor da CIL_{50} ou CIV_{50} da linhagem não-tumoral, no qual valores de IS menores que 2 indicam seletividade não-específica (AYESH; ABED; FARIS, 2014). Conforme apresentado na Tabela 4, todos os valores de IS foram superiores à 2.

Tabela 4 - Valores de IS do OE de zimbro na fase líquida e vapor sobre as linhagens utilizadas e submetidas ao tratamento de 24h com o OE de zimbro.

	IS Fase líquida		IS fase vapor	
	MTT	SRB	MTT	SRB
24h	4,43	5,32	>20	7,099

Valores de IS foram todos superiores à 2 indicando seletividade não-específica, o valor de IS do MTT da fase vapor foi apenas estimado, estando acima de 20.

Da mesma forma, que nos ensaios com a linhagem tumoral, os valores de redução de viabilidade celular na linhagem MRC5 foram maiores, em ambos as fases do OE, nos testes utilizando a SRB, ocorrência que pode indicar uma possível ação do OE na expressão/síntese das proteínas de adesão celular, e não relacionado diretamente ao processo metabólico mitocondrial, que é avaliado pelo ensaio de redução do MTT. Esse efeito sobre as proteínas se torna importante de ser avaliado, pois alterações na expressão ou síntese de proteínas de adesão, como a actina, podem modificar a resposta celular tumoral nos eventos de invasão, migração e metástase (SOUSA-SQUIAVINATO, 2019).

No trabalho de Vasilijević *et al.* (2018) a linhagem MRC5 também foi utilizada como controle, e OE de zimbro, na fase líquida, apresentou também maior seletividade para as células de carcinoma de pulmão, nesse caso a A549. Os valores de CIL₅₀ obtidos pelos autores foram de 69,4 µg/mL para a linhagem tumoral e de 120 µg/mL para o controle, todavia com o IS de 1,74, menor do que o encontrado neste trabalho. Cabe ressaltar que na análise da composição do OE realizada pelos autores o α -pineno foi também identificado como composto majoritário (23,61%), mas em uma concentração menor da do OE utilizado neste trabalho (69,94%).

O valor de IS com o vapor do OE, nos ensaios de MTT, foi maior do que o da fase líquida, o que pode estar relacionado ao fato de que diferentes compostos do OE volatilizem sob as condições trabalhadas, além disso o IS não pode ser calculado, apenas estimado, uma vez que não foi encontrada toxicidade nas maiores concentrações utilizadas.

Pelo fato de não existirem trabalhos que envolvam o uso dos OEs ou de seus compostos majoritários na sua fase vapor, se torna necessária identificar qual o composto se encontra na fase volátil e em que concentração, bem como a investigação do possível mecanismo de ação do OE de zimbro, para que, assim, seja

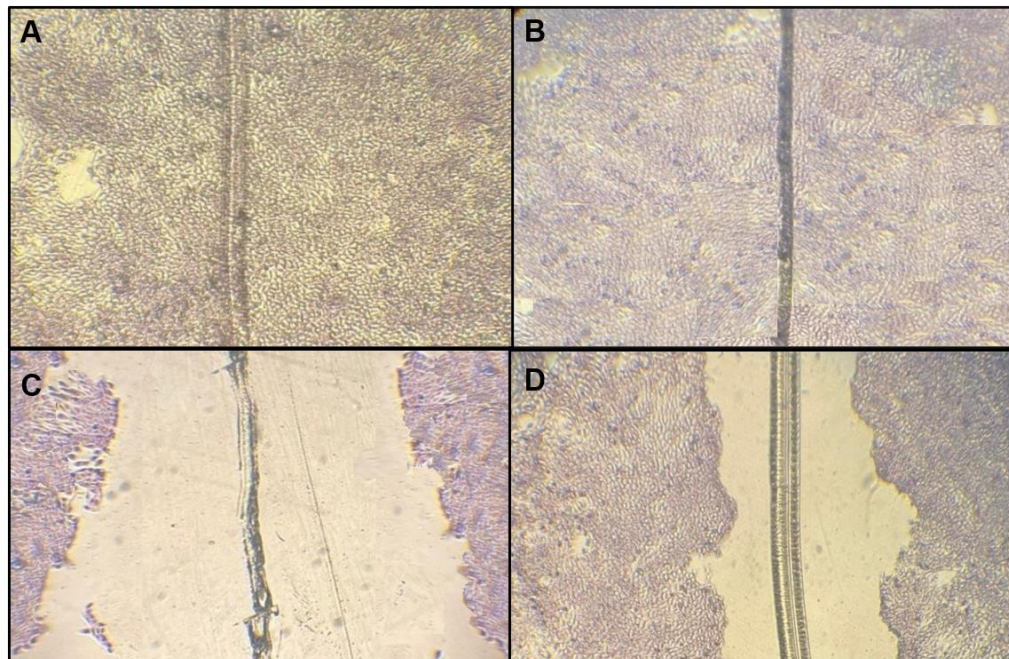
possível relacionar a diferença encontrada entre os dois ensaios de determinação de viabilidade celular.

5.2.3 Avaliação de migração celular por meio do ensaio de “*Scratch Assay*” e emprego do corante Rosenfeld

A fim de investigar os possíveis mecanismos envolvidos na redução da viabilidade celular do OE sobre a linhagem tumoral, e considerando os resultados que apontaram, de forma significativa, maior redução nos ensaios de SRB, foram realizados ensaios de migração celular com as fases líquida e vapor do OE. Ambas foram feitas em placas de 24 poços, utilizando-se as concentrações de 1500 µg/mL para a fase vapor e de 250 µg/mL para a fase líquida, concentrações inferiores aos valores de CIL_{50} e CIV_{50} obtidos.

Os resultados indicaram uma redução da proliferação celular da linhagem nos tratamentos com ambas as fases do OE, líquida e vapor, sendo uma maior porcentagem de redução de crescimento observada na fase líquida, conforme indicado na Figura 11.

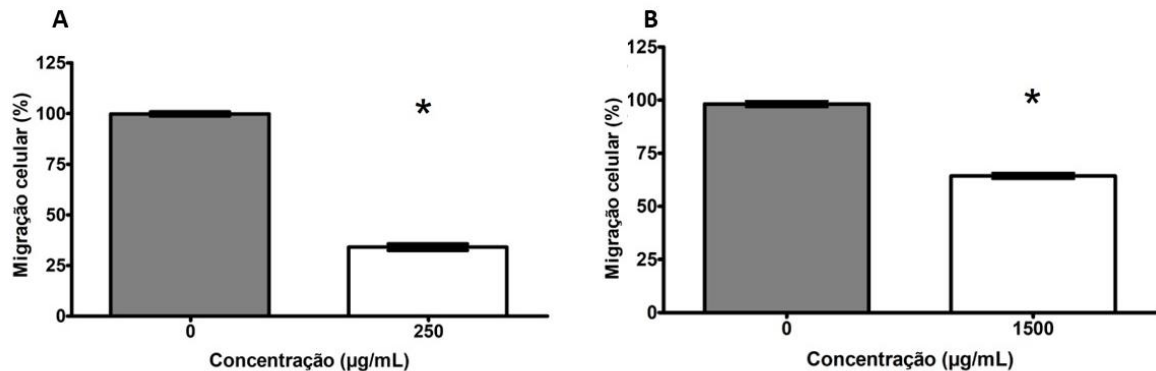
Figura 11 - Visualização em microscópio óptico do efeito das fases líquida e vapor do OE de zimbro sobre a proliferação celular da linhagem H292 pelo *Scratch Assay*.



Scratch Assay realizado com as células H292 com o tratamento controle da fase líquida (A), controle da fase vapor (B) e células tratadas com o OE de zimbro na fase líquida (C) e fase vapor (D).

A migração celular foi reduzida em cerca de 66% nos ensaios com a fase líquida e em cerca de 35,7% nos ensaios com a fase vapor do OE, dados apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Efeito das fases líquida e vapor do OE de zimbro sobre a proliferação celular da linhagem H292.



A migração celular (%) foi determinada por meio dos ensaios *Scratch Assay* após 24 horas de tratamento com o OE na fase líquida (A) e vapor (B). Os resultados são expressos como média e desvio padrão com $n=8$ (vapor) e $n=8$ (líquida). O símbolo * representa a diferença estatística em relação ao controle (etanol + P.A. + solução salina 0,9% ou meio de cultivo) obtida teste U de Mann-Whitney, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Dessa forma, foi possível observar que o OE de zimbro, no período de 24 horas, demonstrou diferença significativa na redução da migração celular e proliferação da linhagem tumoral, corroborando assim com a possível atividade antitumoral do OE apresentada nos ensaios de redução de MTT e de coloração de proteínas com SRB.

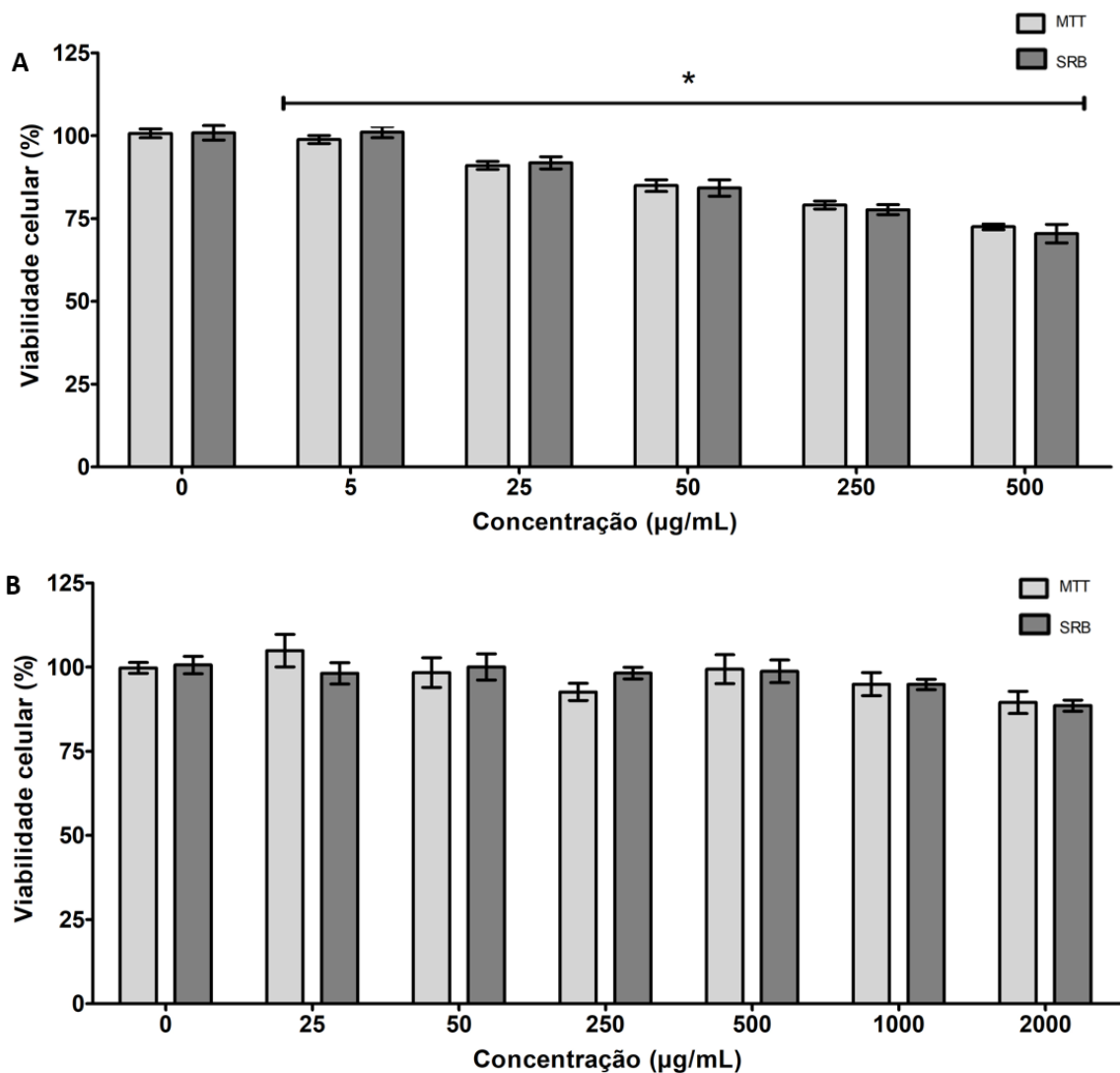
Já foi demonstrado, que o OE de *J. communis* pode apresentar efeito na redução da proliferação celular de tumor colorretal em modelos *in vivo*, o que pode ser atribuído ao efeito na redução da expressão de COX-2, uma enzima relacionada à proliferação epitelial das células desse tipo tumoral (YAMAN *et al.* 2021).

O extrato de *J. communis* também já demonstrou efeito na redução da proliferação de um carcinoma hepatocelular em modelos *in vivo* (camundongos Balb/c), sendo observada redução na produção de VEGFR1 e VEGFR2, fatores associados ao crescimento endotelial (HUANG *et al.* 2021).

5.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS DAS FASES LÍQUIDA E VAPOR DO OE DE ZIMBRO

Para verificar a toxicidade do OE na linhagem J774.A foi determinada a viabilidade celular por meio de ensaios, paralelos, de redução de MTT no período de 24h, dessa forma seria assegurado que as concentrações utilizadas mantivessem as células viáveis no momento de realização dos ensaios de produção de EROs. Conforme os dados da Figura 13, a maior concentração do OE na fase líquida (A) gerou redução de viabilidade de aproximadamente 30%. Na fase vapor (B) o OE não reduziu significativamente a viabilidade celular mesmo empregado na concentração mais alta.

Figura 13 - Efeito das fases líquida e vapor do OE de zimbro em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular da linhagem J774.A.



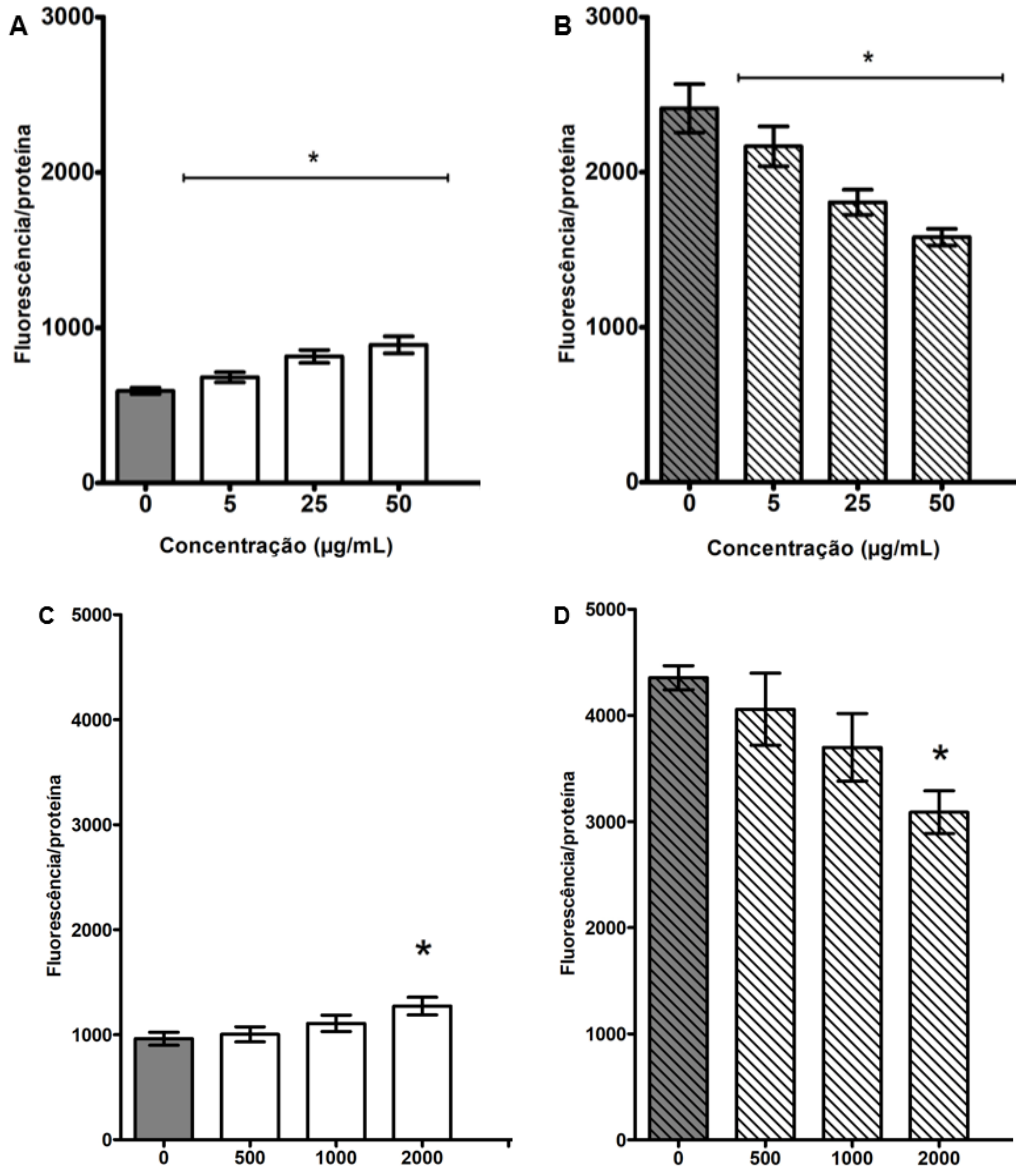
A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT e coloração por SRB após 24 horas de tratamento com o OE na fase líquida e vapor. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com n=4 (vapor) e n=8 (líquida) por ensaio. O símbolo * representa a diferença estatística em relação ao controle (etanol + P.A. + solução salina 0,9% ou meio de cultivo) obtida por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Mesmo com a redução da viabilidade na maior concentração nos ensaios de fase líquida a toxicidade do OE pode ser considerada baixa quando comparando com dados na literatura, como no trabalho de Xavier *et al.* (2021) no qual os autores avaliaram a toxicidade do OE utilizando duas diferentes amostras de OEs de zimbro e empregando a linhagem de macrófagos murinos e RAW 264.7. Os pesquisadores obtiveram para as amostras do OE os valores de CI_{L50} de 23,98 e 84,80 $\mu\text{g/mL}$.

Envolvendo modelos *ex vivo* e o composto majoritário do OE, Rodrigues *et al.* (2015) avaliaram a citotoxicidade do α -pineno, extraído de *Syzygium cumini*, e observaram que o composto reduziu a viabilidade celular em 50% na concentração de 425,2 $\mu\text{g/mL}$ quando o modelo utilizado foi o de macrófagos murinos e na concentração de 233,6 $\mu\text{g/mL}$ para eritrócitos humanos, relatando que, nessa concentração, o índice de seletividade para essas células indicava uma concentração segura.

Na sequência, para verificar a produção de EROs gerada de forma intracelular, a linhagem J774.A foi exposta às fases líquida ou vapor do OE de zimbro, sendo tratada pelo período de 24 horas com as concentrações 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Na Figura 14 está apresentada a detecção da produção de EROs expressa em unidades de fluorescência que foi induzida pelo OE de zimbro por ambas as fases, e também os valores correspondentes à produção pelas células expostas ao peróxido de hidrogênio.

Figura 14 - Formação de EROs em células J774.A tratadas com as fases vapor e líquida do OE de zimbro na presença ou ausência de peróxido de hidrogênio.



Detecção da produção de EROs em células J774.A tratadas com o OE de zimbro em diferentes concentrações por 24 horas. Em (A) fase líquida sem estímulo de peróxido de hidrogênio e (B) com estímulo (250 µM). Em fase vapor com estímulo (C) e (D) sem o estímulo de peróxido de hidrogênio (250 µM). Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com n=8 (líquida) e n= 4 (vapor) por ensaio.

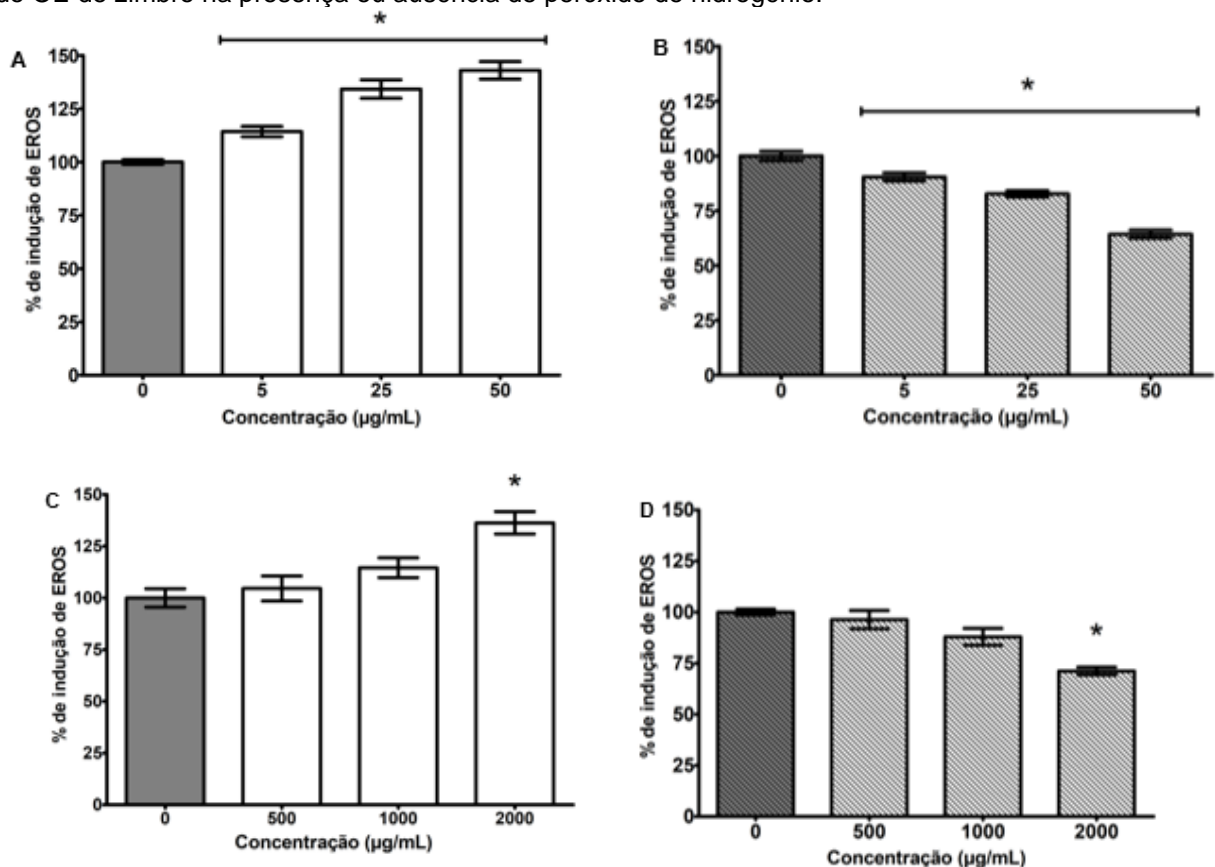
O peróxido de hidrogênio pode induzir a produção de EROs, dessa forma cabe a sua utilização nos ensaios como forma de controle positivo (ROCHA *et al.*, 2018). Em ensaios que utilizam do DCFH-DA, a sonda DCFH, utilizada, pode ser oxidada pelo peróxido de hidrogênio e também por outros oxidantes celulares, como peroxidases e íons metálicos (FORMAN *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2010).

A partir dos resultados (Figura 14), é possível observar que os tratamentos utilizando tanto com a fase líquida quanto com a vapor levaram ao aumento da produção basal de EROs, porém quando associados ao peróxido de hidrogênio (células estimuladas), contrariamente foi observada a redução da produção de EROs.

Avaliando os dados normalizados pelo controle, expressos em porcentagens, apresentados na Figura 15, na fase líquida do OE, todas as 3 concentrações testadas sem a presença do peróxido (A) apresentaram efeito significativo na produção de EROs basal, induzindo um aumento de 14,3%, 34,2% e 43% respectivamente. E com redução da produção de EROs, nos valores respectivos de 9,7%, 11,3% e 35,8% quando associadas ao peróxido de hidrogênio (B).

Já na fase vapor, foi demonstrado que apenas no tratamento de maior concentração (2000 µg/mL) o OE demonstrou efeito significativo na produção de EROs, com o aumento da produção basal em 36,3% e redução da produção estimulada com peróxido de hidrogênio em 28,9%.

Figura 15 - Percentual de formação de EROs em células J774.A tratadas com as fases vapor e líquida do OE de zimbro na presença ou ausência de peróxido de hidrogênio.



Percentual de indução de EROs em células J774.A tratadas com a fase vapor (A e B) e líquida (C e D) do OE de zimbro em diferentes concentrações por 24 horas sem a exposição ao peróxido de hidrogênio (250 µmL) (A e C) e com a exposição (B e D). Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com n=4 (vapor) e n= 8 (líquida) por ensaio.

O símbolo * representa a diferença estatística em relação ao controle (etanol + P.A. + solução salina 0,9% ou meio de cultivo) obtida por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados indicam que, quando na presença do OE, seja na sua fase líquida ou vapor, a produção de EROs é exacerbada se comparando ao valor de produção basal nos controles. Porém, quando está associado ao peróxido de hidrogênio a oxidação de DCFH a DCF é reduzida de forma dose dependente, sendo que tais efeitos são mais evidenciados nos ensaios com a fase líquida do OE.

A ação antioxidante do OE de zimbro pelo ensaio de DCFH-DA já foi demonstrada se comparando o efeito do óleo extraído da planta, de duas localidades, sobre a linhagem de macrófagos RAW 264.7 (XAVIER *et al.* 2021). Em ambos os óleos os compostos majoritários eram o α -pineno e o limoneno, sendo que, em uma das amostras o OE foi capaz de reduzir a produção em 78% e na outra em 68% quando comparado ao controle com quercetina. Porém cabe-se destacar que as concentrações de OE utilizadas para a obtenção de tais valores foram superiores às utilizadas no presente trabalho, o que se observa na indicação de que o valor de inibição de oxidação em 50% (GI_{50}) foram, respectivamente, de $324,76 \pm 8,13 \mu\text{g/mL}$ e $1563,29 \pm 58,02 \mu\text{g/mL}$.

Dessa forma, a ação aqui relatada, na fase líquida do óleo essencial de zimbro, pode estar relacionada com a presença do α -pineno, o que pode ser corroborado também pelo trabalho de Porres-Martínez *et al.* (2016), no qual esse monoterpene reduziu de forma significativa a produção de EROs nas células PC12 tratadas com peróxido de hidrogênio, sendo que, quando elas foram tratadas com o α -pineno *per se* não foi observado indução do aumento de produção de EROs. Tal efeito foi atribuído ao aumento da concentração do rNrf2, fator responsável pela manutenção do estresse oxidativo a partir da regulação da expressão das enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona redutase e hemeoxigenase 1.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OE DE ZIMBRO

5.4.1 Teste de Macrodiluição em Caldo

A fim de investigar a susceptibilidade dos microrganismos frente aos tratamentos com a fase líquida do OE de zimbro, eles foram submetidos aos ensaios de macrodiluição em caldo, nos quais a turbidez dos meios nos tubos utilizados para o cultivo dos microrganismos indicará se houve ou não inibição ou redução do crescimento dos mesmos. Tal método, segundo Bona *et al.* (2014) se caracteriza por possuir resultados mais reprodutíveis, não deixando de ser econômico e confiável.

A montagem seriada dos tubos permite também uma leitura visual inicial dos resultados, conforme demonstrado na Figura 16, sendo possível comparar a turbidez dos frascos com o controle negativo (1-) e positivo (1+) com o restante das diluições.

Figura 16 - Teste de macrodiluição em caldo correspondente à avaliação do efeito líquido do OE sobre os microrganismos



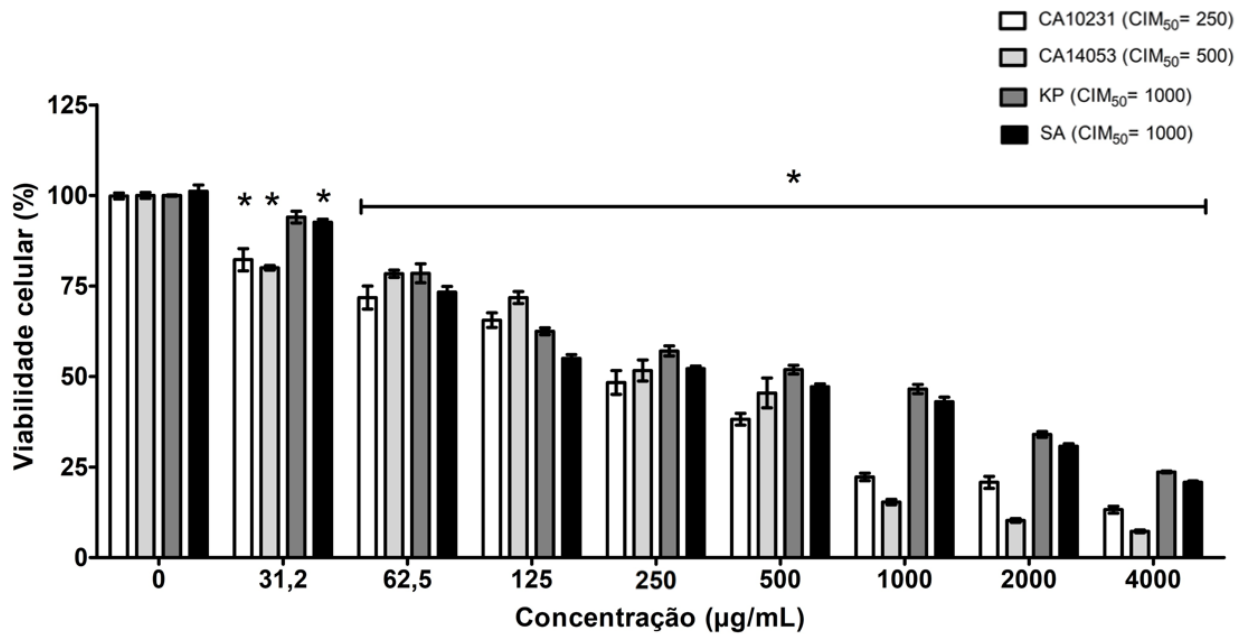
Fonte: O autor.

Para a avaliação dos efeitos antifúngicos foram utilizadas as cepas de *Candida albicans* (CA) 10231 e *Candida albicans* 14053. Para ambas foram possíveis de serem encontrados os valores de CIM₅₀ nas concentrações de 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente, conforme apresentado na Figura 17. Além disso, ambas as cepas chegaram ao valor de CIM₉₀, na qual a CA 14053 chegou ao valor de redução de mais de 90% de viabilidade nos tratamentos com o OE de zimbro na fase líquida, o que se decorreu na maior concentração utilizada. A redução na viabilidade da CA 10231 foi de 91,77% e da CA 14053 de 94,8% nas concentrações de 4000 µg/mL, o que corresponde ao valor de CIM₉₀.

Para avaliação dos efeitos antibacterianos foram utilizadas a cepa gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (KP) e a cepa gram-positiva *Staphylococcus aureus*

(SA). Ambos microrganismos foram mais resistentes ao efeito do OE de zimbro, uma vez que nos dois casos os valores de CIM₅₀ foram resultantes da concentração de 1000 µg/mL, e não foram atingidos valores de CIM₉₀, conforme apresentado na Figura 17. Na maior concentração do OE testada (4000 µg/mL) a redução de viabilidade foi de 72,3% para KP e de 79,3% para AS, o que indica que a bactéria gram-positiva se apresentou como mais sensível ao efeito do OE.

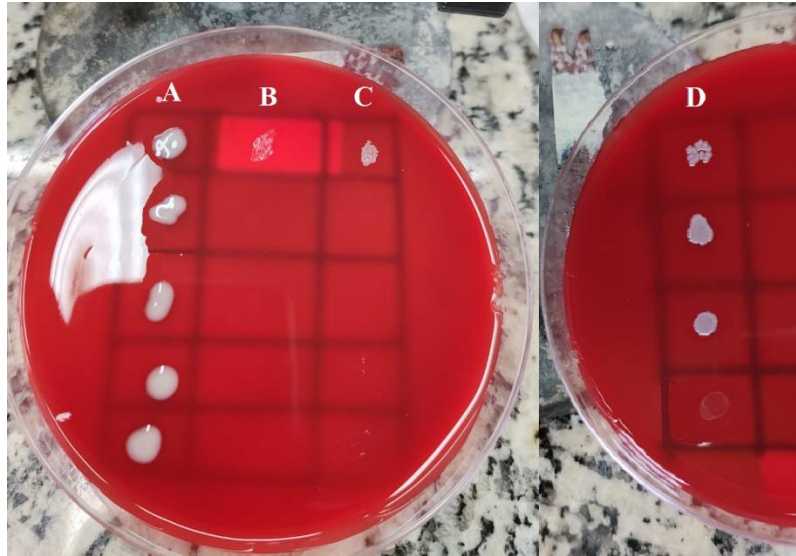
Figura 17 - Avaliação do efeito antifúngico e antibacteriano da fase líquida do OE de zimbro em diferentes concentrações.



A inibição de crescimento (%) foi determinado por meio dos ensaios de macrodiluição em caldo após 24 horas de tratamento com o OE na fase líquida sobre as duas cepas de *C. albicans*, 10231, *C. albicans* 14053, *K. pneumoniae* (KP) e *S.aureus* (SA). Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes. O símbolo * representa a diferença estatística em relação ao controle (caldo) obtida por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Após o período de 24h do tratamento os microrganismos foram semeados em uma placa de ágar sangue para a verificação do efeito microbicida nas maiores concentrações testadas. O resultado pode ser observado na Figura 18.

Figura 18 - Efeito microbicida nas quatro cepas tratadas com a fase líquida do OE de zimbro.



Semeadura de *K. pneumoniae* (A), *C. albicans* 10231 (B), *C. albicans* 14053 (C) e *S.aureus* (D) após o período de tratamento em macrodiluição do OE de zimbro. De cima para baixo foram semeadas os microorganismos correspondentes ao: Controle positivo e aos tratamentos de concentração de 500, 1000, 2000 e 4000 μ L.

A partir da Figura 18 é possível observar que a fase líquida do OE de zimbro impediu o crescimento posterior das duas cepas de *C. albicans* depois do período de 24 horas após o tratamento, além de levar à redução no crescimento de *S. aureus* na maior concentração testada, porém não a inibiu de forma total. O OE de zimbro não apresentou efeito bactericida na cepa de *K. pneumoniae*.

No trabalho de Pepeljnjak *et al.* (2005) os autores utilizaram dois métodos de verificação da atividade da fase líquida do OE de zimbro, o primeiro deles, de difusão em ágar, demonstrou que dentro das cepas testadas, as de *S. aureus* MFBF, *S. aureus* ATCC 6538 e de *C. albicans* MFBF foram sensíveis com zonas de inibição de crescimento de 11, 14 e 9 mm, respectivamente.

No método de diluição, as cepas gram-positivas também se mostraram sensíveis, e, da mesma forma que neste trabalho, os menores valores de CIM (%V/V) foram encontrados nos fungos, corroborando com os dados da literatura que o OE de zimbro possui potencial antifúngico. Os valores de CIM para SA MFBF, SA 6538, e CA MFBF foram de, respectivamente, 40, 15 e 1(%V/V). Em ambos os ensaios as bactérias gram-negativas apresentaram maior resistência, com zonas de inibição com valores menores e valores de CIM maiores.

Já em relação a *K. pneumoniae*, o OE de zimbro já demonstrou efeito na sua inibição na concentração de 5 μ L do OE *per se*, porém, na concentração de 20 μ L,

houve redução do crescimento no período de tratamento de 24h a partir do método de difusão em disco. (XHAXHIU *et al.* 2013)

O OE de zimbro e duas diferentes frações suas enriquecidas com α -pineno (F1) e α -pineno combinado com sabineno (F2), já foram testadas em ensaios de difusão em ágar em 9 cepas, incluindo *S. aureus* (ATCC 6538) e *C. albicans* (GLISC *et al.* 2007). Os melhores resultados da zona de inibição foram encontrados nas frações enriquecidas. Os diâmetros para o OE, F1 e F2, respectivamente, foram de 1mm, 17mm, 11mm para *C. albicans* e 1mm, 13mm e 12mm para a *S. aureus*.

As cepas gram-negativas testadas também demonstraram maior resistência, sendo que algumas não apresentaram qualquer inibição na presença do OE puro. Na composição desse OE, os autores verificaram que o α -pineno estava presente em 86.2%, concentração maior do que a do OE utilizado neste trabalho, fato que pode respaldar a atividade antimicrobiana mais fraca aqui apresentada.

Também envolvendo os compostos majoritários de OEs, o estudo de Leite *et al.* (2007) demonstrou que o β -pineno e o α -pineno possuem efeito inibitório no crescimento de quatro cepas de *S. aureus* no bioensaio de microplaca e os valores de CIM foram estabelecidos entre 10 e 20 $\mu\text{L/mL}$.

5.4.2 Teste de Microatmosfera

Após a obtenção dos valores de CIM₅₀ os testes de microatmosfera foram realizados, conforme descrito no item 4.9 da metodologia. As concentrações testadas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações de CIM₅₀ utilizadas no teste de microatmosfera

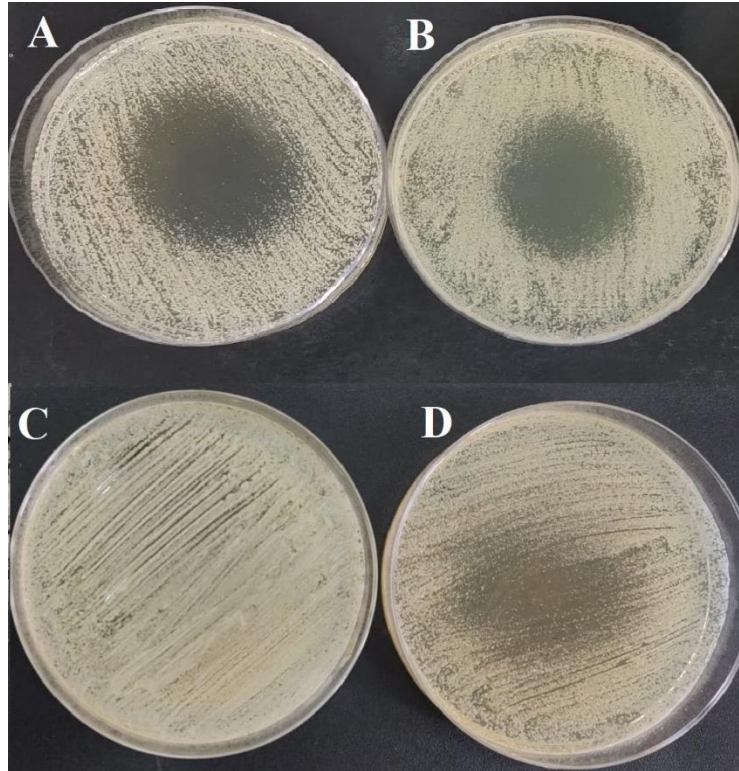
Microrganismo	Concentração $\mu\text{L/mL}$
<i>C. albicans</i> 10231	250
<i>C. albicans</i> 14053	500
<i>K. pneumoniae</i>	1000
<i>S.aureus</i>	1000

Valores de CIM₅₀ obtidos através do ensaio de macrodiluição em caldo.

Após o período de 24h de tratamento, o crescimento dos microrganismos foi avaliado e fotografado, e, nos casos em que houve a formação do halo indicando a

zona de inibição de crescimento, foi realizada a medição do diâmetro formado. As cepas de *C. albicans* foram as únicas em que houve a formação do halo, conforme se observa na Figura 19.

Figura 19 - Crescimento das quatro cepas tratadas com a fase vapor do OE de zimbro no teste de microatmosfera.



Semeadura de *C. albicans* 10231 (A), *C. albicans* 14053 (B), *K. pneumoniae* (C) e *S.aureus* (D) após o período de tratamento de 24h com a fase vapor do OE de zimbro nas concentrações de CIM₅₀ obtidas.

As cepas de *C. albicans* 10231 e de *C. albicans* 14053 apresentaram a formação da zona de inibição do diâmetro de 3,8 mm e 3,5 mm respectivamente, demonstrando sensibilidade à fase vapor do OE, enquanto que as cepas de *K. pneumoniae* e *S.aureus* não formaram halos, mesmo sendo possível observar que, na última cepa, houve alteração no seu crescimento, indicando que a bactéria gram-negativa possui baixa sensibilidade ao efeito da fase vapor do OE de zimbro, como já observado na fase líquida.

A fase vapor o OE de zimbro já foi avaliada em estudos como o de Ghabraie *et al.* (2005), no qual ele não exibiu nenhuma atividade de inibição sobre as cinco bactérias testadas, incluindo a *S.aureus*. Os autores também avaliaram a atividade do OE na sua fase líquida e pelo método de difusão em ágar, no qual apenas neste último método o zimbro apresentou efeito de inibição contra *L. monocytogenes*. Já no

trabalho de Krumal *et al.* (2009) o OE de zimbro na sua fase vapor, demonstrou bom efeito antimicrobiano e antifúngico contra dezessete cepas testadas, sendo que apenas cinco, dentre os quinze testados, demonstraram efeito semelhante de inibição.

Tal variação de resultados pode estar relacionada à composição do OE utilizado, uma vez que no primeiro caso os três compostos majoritários eram o α -pineno (75,6%), δ -3-careno (5,4%), β -pineno (3,8%) e no segundo caso eram o α -pineno (54,1%) β -pineno (17,8%) limoneno (12,5%). Diferentes tipos de variação podem estar relacionados às ações dos OEs, conforme descrito por Inouye (2001) a composição do OE é uma delas, uma vez que OEs que contém aldeídos ou fenóis como componentes majoritários são considerados mais eficazes do que aqueles que são constituídos principalmente por álcoois. Nessa categoria ainda os OEs menos ativos são aqueles que apresentam cetona ou hidrocarbonetos como componente majoritário.

Além disso, mesmo sendo demonstrado que bactérias gram-negativas são mais resistentes do que as positivas frente à utilização de OEs (DHIFFI *et al.*, 2016; BHAVANIRAMYA *et al.* 2019) essa ocorrência parece não ser um fator de interferência na utilização da fase vapor do OE, havendo testes que corroboram esses resultados entre os dois tipos de bactérias (LOPES, 2005). Inouye (2006) também aponta que existem casos em que os OEs apresentam forte atividade antimicrobiana em ensaios de difusão de ágar, mas fraca atividade nos testes com o seu vapor e vice versa.

Segundo Tyagi e Malik (2011) a atividade mais eficaz da fase vapor dos OEs pode se relacionar, à habilidade de compostos como monoterpenos de serem solubilizados nas membranas celulares. No caso dos dados obtidos aqui esse fenômeno não foi observado, uma vez que a cepa de *K. pneumoniae*, que se caracteriza por ser gram-negativa foi a que possuiu maior resistência aos efeitos do OE de zimbro.

De fato, os ensaios utilizados nesse trabalho avaliando a fase líquida e vapor ainda podem apresentar resultados diferentes caso seja utilizado o método em de difusão em ágar, que se caracteriza por fornecer um meio sólido de crescimento para os microrganismos. Porém, os resultados apresentados aqui indicam que o OE de zimbro possui potencial antimicrobiano, principalmente antifúngico, uma vez que os resultados demonstraram efeitos tanto fungistático quanto fungicida.

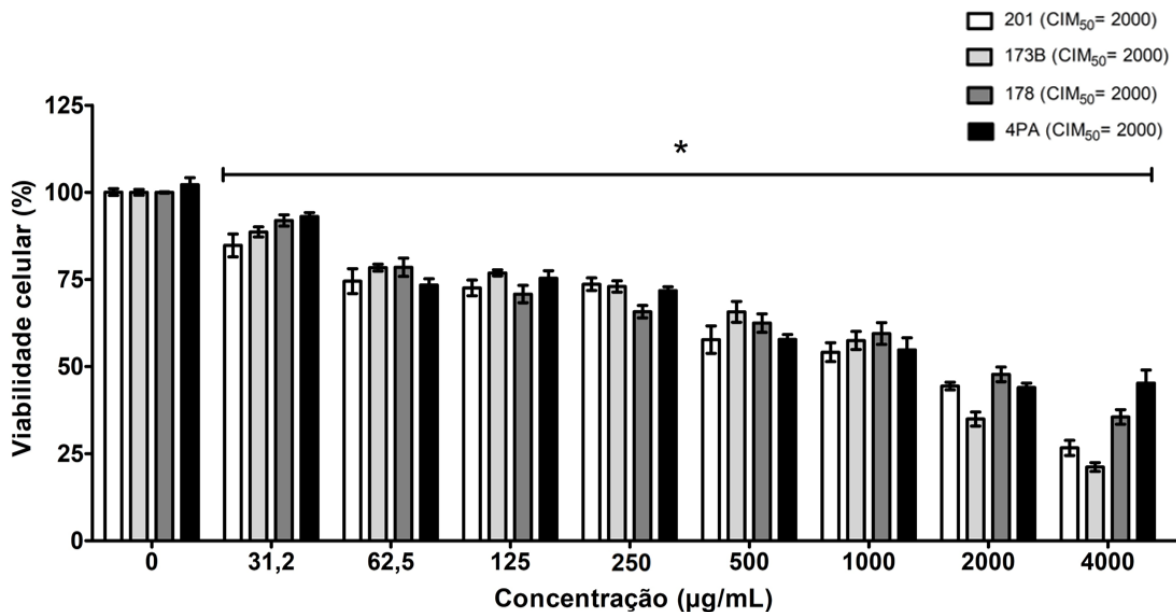
5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO OE DE ZIMBRO COM CEPAS ORAIS OBTIDAS DE PACIENTES DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

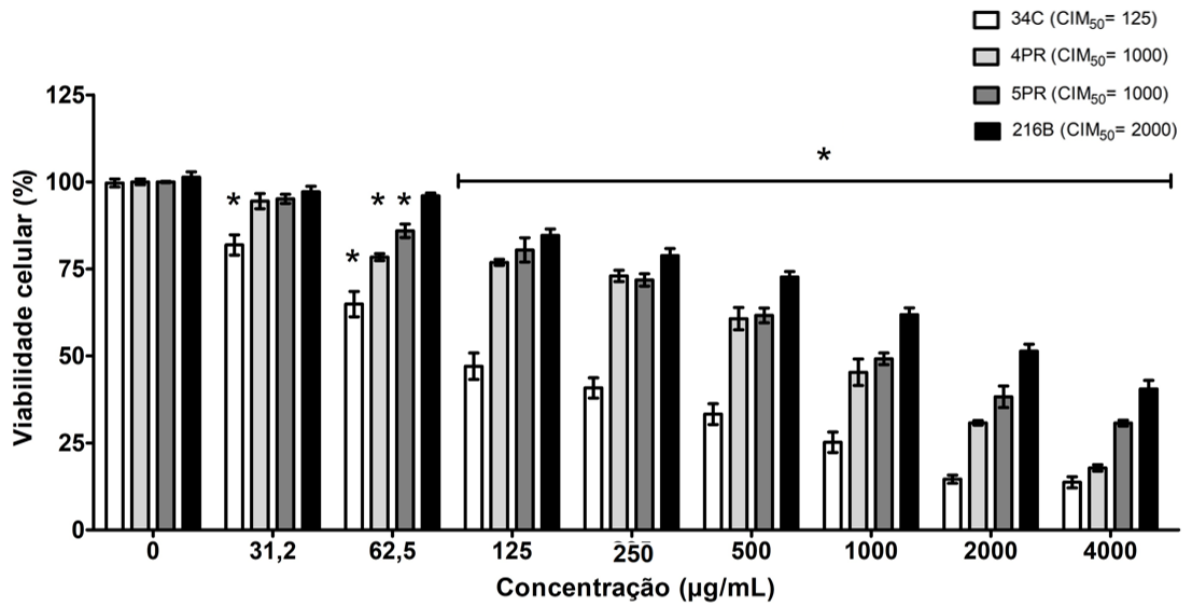
5.5.1 Teste de Macrodiluição em Caldo

Uma vez que os resultados obtidos demonstraram uma maior sensibilidade das cepas fúngicas ao OE de zimbro, foram utilizadas apenas cepas de *C. albicans* spp. isoladas do biofilme subgingival e saliva de pacientes como forma de comparação aos resultados obtidos com as cepas ATCC.

Nesses ensaios, apenas uma das cepas (34C) apresentou valor inferior de CIM₅₀ em relação às duas cepas ATCC, todas as outras obtiveram valores superiores, conforme se observa na Figura 20.

Figura 20 - Avaliação do efeito antifúngico da fase líquida do OE de zimbro em diferentes concentrações conta as cepas orais de *C. albicans*.





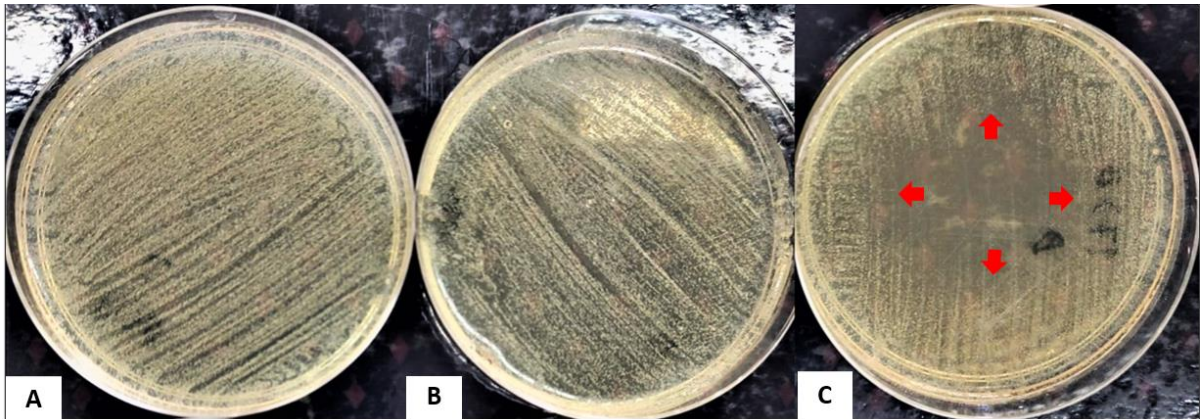
A inibição de crescimento (%) foi determinado por meio dos ensaios de macrodiluição em caldo após 24 horas de tratamento com o OE na fase líquida sobre as oito cepas de *C. albicans*. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes. O símbolo * representa a diferença estatística em relação ao controle (caldo) obtida por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com Duarte *et al.* (2005), a atividade de um composto natural sobre microrganismos pode ser considerada forte quando os valores de CIM₅₀ estão abaixo de 0,5 mg/mL, moderada quando situada entre 0,51 e 1,0 mg/mL, e fraca quando apresenta valores acima de 1,1 mg/mL, dessa forma, o OE apresentou atividade forte contra apenas três dos oito microrganismos clínicos, o que compreende a minoria dos testados, além disso mais da metade necessitou de altas concentrações do OE (2000µL/mL) o que indica baixa sensibilidade dessas cepas ao OE.

Óleos essenciais, como o de *Origanum vulgare* (orégano), já demonstraram efeito na inibição do crescimento de cepas de *C. albicans* orais e também na produção da fosfolipase, uma enzima essencial no processo de adesão e proliferação dessas cepas (FURLETTI *et al.* 2011; BRONDANI *et al.* 2017).

5.5.2 Teste de Microatmosfera

Figura 21 - Crescimento da cepa 34C tratada com a fase vapor do OE de zimbro no teste de microatmosfera.



Semeadura de *C. albicans* 34C, com controles (A e B) e o tratamento (C) após o período de tratamento de 24h com a fase vapor do OE de zimbro nas concentrações de CIM₅₀ obtidas.

As oito cepas de *C. albicans* também foram submetidas aos ensaios de microatmosfera, porém apenas nos ensaios com a cepa 34C, a qual apresentou o menor valor de CIM₅₀, houve formação de halo quando comparado com o controle no período de 24 horas, conforme ilustrado na Figura 21.

Dessa forma, os resultados indicaram que o OE de zimbro na sua fase vapor, ao ser testado com cepas clínicas, se demonstrou menos ativo contra a inibição do crescimento das cepas fúngicas, porém o halo observado na cepa 34C foi maior do que o observado nas cepas ATCC, com o diâmetro de 4,7 mm.

A *Candida albicans* é considerada, dentro dos microrganismos oportunistas, uma das mais frequentes causadoras de infecções orais, agudas ou crônicas (BRONDANI *et al.* 2017), além disso pode levar à indução de processos carcinogênicos orais, especialmente em pacientes com sistema imunológico enfraquecido (COSOLA *et al.* 2021). Dessa forma, estudos vem buscando novos compostos que auxiliem no tratamento das infecções causadas por essas cepas.

Cabe o destaque do estudo de Rivera-Yañez *et al.* (2017) em que o composto α -pineno, o majoritário do OE utilizado neste trabalho, demonstrou atividade moderada na inibição de três cepas de *C. albicans* ATCC e um clínica, com concentrações de CIM₅₀ de 5 mg/mL. Além disso, nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que esse composto pode ter influência na expressão do gene INT1,

intimamente relacionado ao processo de adesão, crescimento e morfogênese desse gênero de fungos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados, foi possível realizar uma comparação sobre os efeitos observados em ambas as fases do OE, conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4 - Comparativo entre as duas fases do OE.

Comparação dos efeitos das duas fases do OE	
Antitumoral	Líquida > Vapor
Antioxidante	Líquida > Vapor
Antibacteriano	Líquida > Vapor
Antifúngico	Líquida > Vapor

Fonte: O autor, 2023.

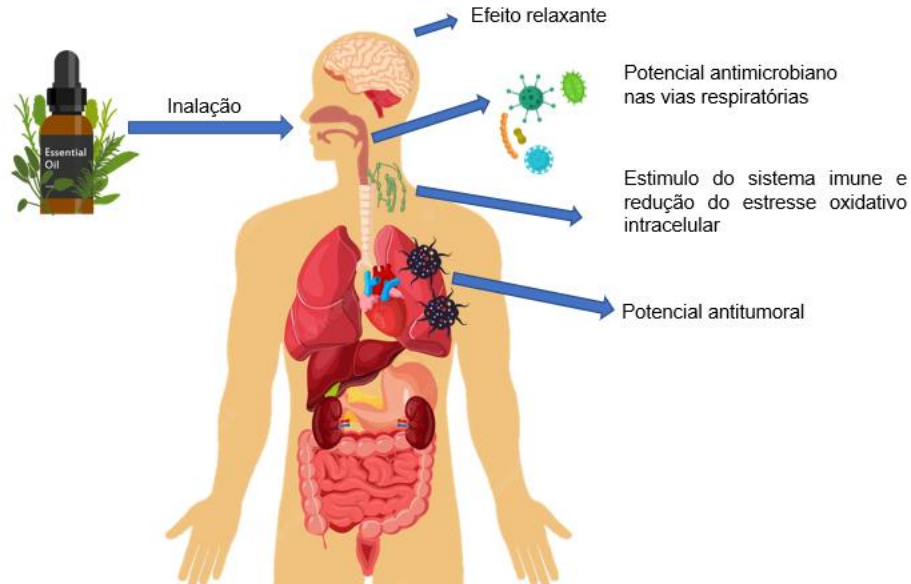
Muitos OEs já foram relatados previamente a este trabalho por demonstrarem diferentes efeitos benéficos ao sistema respiratório, assim se torna relevante investigar ainda mais à fundo os possíveis mecanismos de ação dos compostos presentes nos OEs, especificamente, do OE de zimbro, devido aos efeitos aqui demonstrados. Respaldo no fato de que OEs apresentam uma variedade de biomoléculas em sua composição, que também já foram relatadas ter efeitos sobre doenças como asma, bronquite e infecções por microrganismos (VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, *et al.*, 2012).

Salientamos de que os usos dos OEs podem vir a se tornar benéfico não só no tratamento, mas na prevenção de doenças do trato respiratório. Em especial, por considerarmos que o pulmão é um órgão altamente vascularizado, com grande superfície de contato, os componentes voláteis, quando inalados, poderiam ser absorvidos e transportados para a corrente sanguínea com maior eficácia, podendo assim ser considerada uma terapia alternativa e/ou complementar para doenças respiratórias.

Cabe ser destacado os casos de pacientes imunocomprometidos durante o tratamento de câncer, uma vez que eles já estão sujeitos às infecções cujos efeitos poderiam ser agravados, principalmente em ambientes hospitalares. Dessa forma, a utilização do OE, além dos efeitos relaxantes, promoveria regulação (estímulo) do

sistema imune e redução do estresse oxidativo intracelular, conforme esquematizado na Figura 22.

Figura 22 - Papel do OE na aromaterapia e possíveis efeitos ao organismo.



Fonte: O autor, 2023.

Além disso, como relatado ao longo desse trabalho, cabe destacar que alguns OEs possuem efeitos sinérgicos à medicamentos utilizados em tratamentos de infecções e câncer, o que poderia reduzir a quantidade de drogas utilizadas, o que acarretaria em uma possível redução de efeitos colaterais.

7 CONCLUSÕES

- As fases vapor e líquida do OE de zimbro apresentaram maior citotoxicidade, com efeito dose-dependente, para as linhagens tumorais, comparada com a linhagem controle que foi baixa.
- Os valores de índice de seletividade foram, nos ensaios de MTT e SRB respectivamente de 4,43 e 5,32 para a fase líquida e de >20 e 7,01 para a fase vapor, apresentando seletividade específica para a linhagem tumoral em ambos os casos.
- As fases vapor e líquida do OE de zimbro levaram à redução da migração celular.
- O OE causou o aumento da produção de EROS intracelular basal e a redução da produção quando associado ao peróxido de hidrogênio quando utilizado a linhagem J774.A como modelo de estudo de macrófagos.
- O ensaio de macrodiluição culminou nos valores de CIM₅₀ de 1000, 1000, 250 e 500 µg/mL para *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* 10231 e *C. albicans* 14053 respectivamente, demonstrando maior efeito inibitório sobre as cepas fúngicas.
- A fase vapor do OE, resultou em uma zona de inibição apenas nas duas *C. albicans*, com os diâmetros de 3,5 mm para a cepa 14053 e de 3,8 mm para a cepa 10231.
- A fase líquida do OE apresentou valores fortes ou moderados de inibição de crescimento das cepas clínicas de *C. albicans* em apenas três das oito cepas testadas.
- A fase vapor do OE demonstrou formação de halo em apenas uma das cepas orais clínicas, porém com um diâmetro maior do que as cepas ATCC.

REFERÊNCIAS

- ANGELINI, P. *et al.* Essential oil with anticancer activity: An overview. **Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements**, v. 2, p. 207–231, 2018.
- ANGELINI, P. *et al.* Essential oil with anticancer activity: An overview. Em: **Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 207–231.
- ANTHONY, K. P.; DEOLU-SOBOGUN, S. A.; SALEH, M. A. Comprehensive Assessment of Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p. C839–C843, 2012.
- AULA, S. *et al.* Biophysical, biopharmaceutical and toxicological significance of biomedical nanoparticles. **RSC advances**, v. 5, n. 59, p. 47830–47859, 2015.
- AYESH, B. M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. In vitro inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 612, p. 1–6, 2014.
- BACÉM, I. A. R. **Composição química e atividade biológica de bagas do zimbro (*Juniperus communis* L.)**. 2018. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2018.
- BAIS, S. *et al.* A Phytopharmacological Review on a Medicinal Plant: *Juniperus communis*. **International scholarly research notices**, v. 2014, p. 634723, 2014.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BAPTISTA-SILVA, S. *et al.* The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 4, p. 279–295, 2020.
- BAYALA, B. *et al.* Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. **American journal of cancer research**, v. 4, n. 6, p. 591–607, 2014.
- BHALLA, Y.; GUPTA, V. K. *et al.* Anticancer activity of essential oils: A review, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, n. 15, p. 3643-3653, 2013.
- BHAVANIRAMYA, S. *et al.* Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 49–55, 2019.

BIAVATTI, M. **Potencial antioxidante e citoprotetor da fase vapor do óleo essencial de Cravo da Índia**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2022.

BLOWMAN, K; MAGALHÃES, M; LEMOS, M.F.L; CABRAL, C; PIRES, I.M. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2018, 2018.

BOCHNIE, K. A.; GREGÓRIO, P. C.; MACIEL, R. A. P. Análise da viabilidade celular por mtt em células tratadas com toxinas urêmicas – revisão. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, 14, 2017.

BONA, E. A. M. D. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.

BOURGOU, S. *et al.* Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 2, p. 210–216, 2010.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BRONDANI, P. L. *et al.* Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 1, p. 94–100, 2018.

BURT, S. A. *et al.* Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. **International journal of food microbiology**, v. 119, n. 3, p. 346–350, 2007.

CABRAL, C. *et al.* Essential oil of *Juniperus communis* subsp. Alpina (Suter) Čelak needles: Chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity: Antifungal activity in needle oil of *Juniperus communis* subsp. Alpina. **Phytotherapy research: PTR**, v. 26, n. 9, p. 1352–1357, 2012.

CHEN, C. C. *et al.* Chemical constituents and anticancer activity of *Curcuma zedoaria* roscoe essential oil against non-small cell lung carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 47, p. 11418–11427, 2013.

CHEN, J. *et al.* Potential of essential oils as penetration enhancers for transdermal administration of ibuprofen to treat dysmenorrhoea. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 10, p. 18219–18236, 2015.

CHEN, W. *et al.* Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. **Journal of pharmacological sciences**, v. 127, n. 3, p. 332–338, 2015.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. **Medicines (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

CLSI. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 20th ed. **CLSI supplement M100**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2015.

COLE, R. A. *et al.* Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica. **Journal of natural medicines**, v. 61, n. 4, p. 414–417, 2007.

CUI, H. *et al.* Antibacterial mechanism of oregano essential oil. **Industrial crops and products**, v. 139, n. 111498, p. 111498, 2019.

DA SILVA BOMFIM, N. *et al.* Antifungal and antiaflatoxigenic activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) against *Aspergillus flavus*. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 37, n. 1, p. 153–161, 2020.

DHIFI, W. *et al.* Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. **Medicines**, v. 3, n. 4, p. 25, 2016.

DI COSOLA, M. *et al.* Candida albicans and Oral Carcinogenesis. A Brief Review. **Journal of fungi**, v. 7, n. 6, p. 476, 2021.

DUARTE, A. *et al.* Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 19, n. 3–4, p. 236–238, 2012.

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

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I. An overview of the biological effects of some Mediterranean essential oils on human health. **BioMed research international**, v. 2017, p. 9268468, 2017.

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

FURLETTI, V. F. *et al.* Action of Coriandrum sativum L. Essential Oil upon Oral Candida albicans Biofilm Formation. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2011, p. 985832, 2011.

GAO, H.-W. *et al.* *Juniperus communis* suppresses melanoma tumorigenesis by inhibiting tumor growth and inducing apoptosis. **The American journal of Chinese medicine**, v. 47, n. 5, p. 1171–1191, 2019.

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

GHABRAIE, M. *et al.* Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]**, v. 66, p. 332–339, 2016.

GLISIC, S., B. *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 4, p. 311–320, 2007.

GONÇALVES, A. C. *et al.* Zimbro (*Juniperus communis* L.) as a promising source of bioactive compounds and biomedical activities: A review on recent trends. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 6, p. 3197, 2022.

GUMRAL, N. *et al.* *Juniperus communis* Linn oil decreases oxidative stress and increases antioxidant enzymes in the heart of rats administered a diet rich in cholesterol. **Toxicology and industrial health**, v. 31, n. 1, p. 85–91, 2015.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.

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

HIRSCH, R. *et al.* Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. **The Lancet Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 299 –311, 2017.

HOSSAIN, F. *et al.* Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. **Food microbiology**, v. 53, n. Pt B, p. 24–30, 2016.

HUANG, N.-C. *et al.* Evaluation of anticancer effects of *Juniperus communis* extract on hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. **Bioscience reports**, v. 41, n. 7, 2021.

ILHAN, S. Essential oils from *Vitex agnus castus* L. leaves induces caspase-dependent apoptosis of human multidrug-resistant lung carcinoma cells through intrinsic and extrinsic pathways. **Nutrition and cancer**, v. 73, n. 4, p. 694–702, 2021.

INCA. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 27 mai. 2021. PATTERSON, A. D. *et al.* Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 2, p. 277–283, 2018.

INOUE, S. *et al.* A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. **Nihon Ishinkin Gakkai zasshi [Japanese journal of medical mycology]**, v. 47, n. 2, p. 91–98, 2006.

JAFRI, H.; AHMAD, I. *Thymus vulgaris* essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal de mycologie medicale**, v. 30, n. 1, p. 100911, 2020.

JUSTUS, B. **MORFOANATOMIA FOLIAR E CAULINAR, ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO VOLÁTIL DE *Lavandula dentata* L., LAMIACEAE**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2016.

KUMAR, P. *et al.* *In-vitro* antibacterial activity of *Juniperus communis* L. against bacterial pathogens. **Environment Conservation Journal**, v. 10, n. 3, p. 101–104, 2009.

LEITE, A. M.; LIMA, E. de O.; SOUZA, E. L. de; DINIZ, M. de F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. de. Efeito inibitório de eugenol, beta-pineno e alfa-pineno sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–33, 2007.

LOBO, V. *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

LÓPEZ, P. *et al.* Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6939–6946, 2005.

LOWE, F. J.; LUETTICH, K.; GREGG, E. O. Lung cancer biomarkers for the assessment of modified risk tobacco products: an oxidative stress perspective. **Biomarkers**, v. 18, n. 3, p. 183-195, 2013.

MATSUO, A. L. *et al.* α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 411, n. 2, p. 449–454, 2011.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252–9287, 2010.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. **Life Sciences**, v. 91, n. 11-12, p. 429–439, 2012.

MUTLU-INGOK, A. *et al.* Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4711, 2020.

NADJIB, B. M. *et al.* LIQUID AND VAPOUR PHASE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *EUCALYPTUS GLOBULUS* ESSENTIAL OIL = SUSCEPTIBILITY OF SELECTED RESPIRATORY TRACT PATHOGENS. **American journal of infectious diseases**, v. 10, n. 3, p. 105–117, 2014.

NAZZARO, F. *et al.* Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2017.

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

NÓBREGA, J. R. *et al.* Antifungal action of α -pinene against *Candida spp.* isolated from patients with otomycosis and effects of its association with boric acid. **Natural product research**, v. 35, n. 24, p. 6190–6193, 2021.

PAPAZIS, K. T. *et al.* Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 208, p. 151-158, 1997.

PEPELJNJAK, S. *et al.* Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). **Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 55, n. 4, p. 417–422, 2005.

PERUČ, D. *et al.* Synergistic potential of *Juniperus communis* and *Helichrysum italicum* essential oils against nontuberculous mycobacteria. **Journal of medical microbiology**, v. 68, n. 5, p. 703–710, 2019.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 8416763, p. 1–13, 2017.

PORRES-MARTÍNEZ, M. *et al.* *In vitro* neuroprotective potential of the monoterpenes α -pinene and 1,8-cineole against H₂O₂-induced oxidative stress in PC12 cells. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 71, n. 7–8, p. 191–199, 2016.

PRAKASH, B. *et al.* Antifungal, antiaflatoxin and antioxidant potential of chemically characterized *Boswellia carterii* Birdw essential oil and its *in vivo* practical applicability in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]**, v. 56, n. 2, p. 240–247, 2014.

RAINA, R. *et al.* Potential of *Juniperus communis* L. as a nutraceutical in human and veterinary medicine. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02376, 2019.

RAMADAN, M. M. *et al.* Essential oils from Egyptian aromatic plants as antioxidant and novel anticancer agents in human cancer cell lines. **Grasas y Aceites**, v. 66, n. 2, 2015.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

REYES-JURADO, F. *et al.* Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 10, p. 1641–1650, 2020.

RIVERA-YAÑEZ, C. *et al.* Anti-candida activity of *Bursera morelensis* Ramirez essential oil and two compounds, α -pinene and γ -terpinene—an in vitro study. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2095, 2017.

ROCHA, C. M. R.; LEITÃO, A. **Avaliação dos efeitos tóxicos de novas substâncias bioativas: detecção de estresse oxidativo e mutagenicidade**. 2018. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-29082018-143122/> >.

RODRIGUES K. K. D. C. 2013. **Estudos dos efeitos oxidantes sobre a resposta inflamatória pulmonar em camundongos expostos à fumaça do cigarro**. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Bioquímica Metabólica e Fisiologia. Ouro Preto, 2013.

RODRIGUES, K. A. DA F. *et al.* *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation *in vitro*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 160, p. 32–40, 2015.

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

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

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.

SOUSA-SQUIAVINATO, A. C. M. *et al.* Cofilin-1 signaling mediates epithelial-mesenchymal transition by promoting actin cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion regulation in colorectal cancer cells. **Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research**, v. 1866, n. 3, p. 418–429, 2019.

TAKAYAMA, C.; DE-FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A. *et al.* Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage

induced by absolute ethanol in the rat. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 2016

TOZETTO, L. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) em células de adenocarcinoma de pulmão (Calu-3). In: **Encontro anual de iniciação científica**, XXV, 2016, Ponta Grossa. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) em células de adenocarcinoma de pulmão (Calu-3) [...] Ponta Grossa: UEPG, 2016.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food chemistry**, v. 126, n. 1, p. 228–235, 2011.

VALDIVIESO-UGARTE, M. *et al.* Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2786, 2019.

VASILJEVIĆ, B. *et al.* Chemical characterization, antioxidant, genotoxic and *in vitro* cytotoxic activity assessment of *Juniperus communis* var. *saxatilis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 118-125, 2018.

VERDE, L. L. **Atividade Antioxidante Da Fase Vapor De Óleos Essenciais: Uma Investigação Preliminar**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2021.

VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S. *et al.* Antimicrobial activity of *Thymus longicaulis* C. Presl essential oil against respiratory pathogens. **Open life sciences**, v. 7, n. 6, p. 1109–1115, 2012.

WRIGHT, B. S. *et al.* Cytotoxic leaf essential oils from neotropical Lauraceae: Synergistic effects of essential oil components. **Natural product communications**, v. 2, n. 12, p. 1934578X0700201, 2007.

XAVIER, V. *et al.* Chemical and Bioactive Characterization of the Essential Oils Obtained from Three Mediterranean Plants. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7472. 2021.

XHAXHIU K, KLLOGJERI, A, KEÇI E. A STUDY OF THE INHIBITORY EFFECT OF SIX ESSENTIAL OILS AGAINST *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*. **Advances in Food Sciences**, v. 35, n. p. 104 - 109 3. 2013

YAMAN, T. *et al.* Chemopreventive efficacy of juniper berry oil (*Juniperus communis* L.) on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rat. **Nutrition and cancer**, v. 73, n. 1, p. 133–146, 2021.

YIN, J. *et al.* Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of the essential oil from *Myric rubra* leaves. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. **Anais 346**, p. 7, 2019.

ZARDI-BERGAOUI, A. *et al.* Chemical Composition and Biological Studies of the Essential Oil from Aerial Parts of *Beta vulgaris* subsp. *maritima* (L.) Arcang. Growing in Tunisia. **Chemistry and Biodiversity**, v. 14, n. 10, 2017.

ZARE, E. *et al.* Synergistic effect of *Zataria multiflora* essential oil on doxorubicin-induced growth inhibition of PC3 cancer cells and apoptosis. **Complementary therapies in clinical practice**, v. 42, n. 101286, p. 101286, 2021.

ZHANG, N.; YAO, L. Anxiolytic effect of essential oils and their constituents: A review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 50, p. 13790–13808, 2019.

ZHANG, Z. *et al.* Synergistic antitumor effect of α -pinene and β -pinene with paclitaxel against non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). **Drug research**, v. 65, n. 4, p. 214–218, 2015.

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido



Universidade Estadual de Ponta Grossa

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Divisão de Pesquisa

Projeto: Perfil de sensibilidade antimicrobiana de micro-organismos comumente isolados de biofilmes bucais após exposição aos raios-X.

Pesquisador Responsável: Elizabete Brasil dos Santos

Endereço: Rua Henrique Thielen, 1150, ap. 01 CEP: 84015-650, Fone: (42) 99378821

e-mail: betebrazil19@hotmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Perfil de sensibilidade antimicrobiana de micro-organismos comumente isolados de biofilmes bucais após exposição aos raios-X”. O motivo que nos leva a estudar este assunto é o surgimento de um grande número de bactérias resistentes aos antibióticos, o que dificulta o tratamento de uma infecção e coloca em risco a saúde do indivíduo. Para realizar este estudo coletaremos saliva com auxílio de um swab (semelhante a um “cotonete”) que será passado pela cavidade bucal e transferido para um tubo de ensaio contendo meio de cultura para bactéria e fungo (caldo BHI). O tubo será encaminhado ao laboratório de microbiologia onde os procedimentos necessários para isolamento, identificação e testes de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos serão realizados. Não há risco em participar do estudo uma vez que o procedimento é simples, rápido e não invasivo. Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido nas clínicas odontológicas da UEPG. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, nas dependências da Disciplina de Microbiologia da UEPG e a outra será fornecida a você. Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____, residente à _____, Prontuário nº _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo ““Perfil de sensibilidade antimicrobiana de micro-organismos comumente isolados de biofilmes bucais após exposição aos raios-X”. de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Ponta Grossa, _____ de _____ de 20....

Nome Assinatura participante Data

Nome Assinatura do Pesquisador Data

Nome Assinatura testemunha Data

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

Comitê de Ética em Pesquisa da UEPG/Bloco M, Sala 12, Campus Universitário

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Av. Carlos Cavalcanti, 4748/Uvaranas/CEP- 84030-900

Homepage: www.uepg.br/coep e-mails: coep@uepg.br (Coordenação) /secceop@uepg.br (Secretaria) /Fone:(42)3220-3108 FAX: (42) 3220-3102

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética – Parecer nº 131.824

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de sensibilidade antimicrobiana de micro-organismos comumente isolados de biofilmes bucais após exposição aos raios-X.

Pesquisador: Elizabete

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08363112.1.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 131.824

Data da Relatoria: 17/10/2012

Apresentação do Projeto:

A evolução dos estudos da microbiologia odontológica é marcante, desde que a presença de micro-organismos foi relacionada à etiologia de infecções bucais frequentes. Entretanto, por serem infecções multifatoriais complexas, a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas infecções é lenta e requer estudos detalhados do papel de cada um desses fatores, individualmente e associados. A resistência microbiana natural ou adquirida aos antibióticos vem aumentando em todo o mundo. São considerados agentes mutagênicos aqueles agentes que quando expostos às células são capazes de causar danos no material genético que são irreversíveis e por isso, são transmitidos aos descendentes. Esses agentes podem ser químico, físico ou biológico. Dentre os agentes físicos, os raios-X são aqui destacados devido ao seu uso frequente no diagnóstico médico-odontológico. A microbiota bucal está exposta aos raios-X em maior ou menor frequência, de acordo com a especialidade e pode ser atingida pelo caráter mutagênico dos raios-X.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar a influência da exposição aos raios-X em protocolos odontológicos na sensibilidade/resistência a antimicrobianos por micro-organismos da cavidade bucal.

Objetivo Secundário:

Determinar o perfil de resistência microbiana de cepas bacterianas e fúngicas isoladas da cavidade bucal.

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 tel M sala 12
 Bairro: CEP: 84.030-900
 UF: PR Município: PONTA GROSSA
 Telefone: (41-3220-3100 Fax: (41-3220-3102 E-mail: cecep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O sujeito da pesquisa não terá riscos.

O trabalho segue normas de biossegurança quanto a exposição dos pesquisadores a riscos biológicos e radiação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho prospectivo de coleta de material com posterior análise microbiológica para as bactérias *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, com análise da influência de radiação sobre o perfil de resposta a antibióticos. Critério de Inclusão:

Todos os pacientes que aceitarem participar do estudo, tendo assinado o TCLE podem ser incluídos no estudo uma vez que os testes serão realizados nos micro-organismos isolados das amostras de saliva e não nos indivíduos.

Critério de Exclusão:

Não farão parte do estudo aqueles que não concordarem em participar do mesmo.

O trabalho é bem fundamentado. A metodologia é compatível com os objetivos. O pesquisador tem experiência na área.

Há condições de estrutura para realização da pesquisa.

A folha de rosto é assinada pelo chefe de departamento de odontologia. Entende-se que o Serviço de Odontologia da UEPG está ciente e autoriza a realização da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi modificado conforme solicitado pela COEP mas permanece muito técnico.

O trabalho é bem fundamentado. A metodologia é compatível com os objetivos. O pesquisador tem experiência na área.

Há condições de estrutura para realização da pesquisa.

A folha de rosto é assinada pelo chefe de departamento de odontologia. Entende-se que o Serviço de Odontologia da UEPG está ciente e autoriza a realização da pesquisa.

Recomendações:

O estudo volta para análise após pendência por uso excessivo de termos técnicos no TCLE.

A modificação resultou em um TCLE mais adequado. Porém, sugere-se aos pesquisadores muito cuidado e sensibilidade ao explicá-lo aos sujeitos da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Apesar de ainda técnico, os pesquisadores aceitaram a sugestão de modificação do TCLE que encontra-se em um nível adequado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 tel M sala 12
 Bairro: CEP: 84.030-900
 UF: PR Município: PONTA GROSSA
 Telefone: (41-3020-3108 Fax: (41-3020-3102 E-mail: seccoep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PONTA GROSSA, 26 de Outubro de 2012

Assinador por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 tel M sala 12
Bairro: CEP: 84.030-900
UF: PR Município: PONTA GROSSA
Telefone: (41)-3220-3108 Fax: (41)-3220-3102 E-mail: seccnep@uepg.br