

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/09/2018.



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



NICOLE CASALLE

**SUSCEPTIBILIDADE DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL AO ÓLEO
ESSENCIAL DE *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* E SUAS PRINCIPAIS
PORÇÕES SOLÚVEIS**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



NICOLE CASALLE

**SUSCEPTIBILIDADE DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL AO ÓLEO
ESSENCIAL DE *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* E SUAS PRINCIPAIS
PORÇÕES SOLÚVEIS**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Ciências
Odontológicas, Área de Diagnóstico Bucal,
da Faculdade de Odontologia de
Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista - UNESP, para obtenção do título
de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Araraquara

2016

Casalle, Nicole

Susceptibilidade de carcinoma espinocelular oral ao óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* e suas principais porções solúveis / Nicole Casalle.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

48 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

1. Carcinoma de células escamosas 2. Óleo de melaleuca
3. Sobrevivência celular 4. Testes para micronúcleos I. Título

NICOLE CASALLE

**SUSCEPTIBILIDADE DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL AO ÓLEO
ESSENCIAL DE *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* E SUAS PRINCIPAIS
PORÇÕES SOLÚVEIS**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

2º Examinador: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

3º Examinador: Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato

Araraquara, 30 de setembro de 2016.

DADOS CURRICULARES

NICOLE CASALLE

NASCIMENTO: 22 de setembro de 1989 – Araraquara - SP

FILIAÇÃO: Carlos Alberto Casalle e Maria Elisabete Corbi Casalle

FORMAÇÃO

1996/2004	Ensino Fundamental (1º grau) - Colégio Progresso de Araraquara- SP
2005/2007	Ensino Médio (2º grau) - Colégio Pablo Neruda- Araraquara- SP
2008/2012	Graduação em Odontologia. - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, Araraquara, SP, Brasil
2014/2016	Mestrado em Ciências Odontológicas, área de Diagnóstico Bucal

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2009/2010	Bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq na Disciplina de Dentística Restauradora- Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2011/ 2012	Bolsista de iniciação científica FAPESP na Disciplina de Prótese Total- Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

*Este trabalho é dedicado com muito amor à
minha amada Vó Maria e à meus pais, que sempre me
apoiam e estiveram comigo em todos os momentos
importantes da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a vida, saúde e condições para que eu realizasse os meus sonhos.

Em especial, agradeço a minha mãe e ao meu pai, por terem sido sempre tão presentes e por não me deixarem desistir dos meus objetivos.

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Araraquara, por ter me recebido de maneira tão maravilhosa. Por ser onde passei os melhores anos da minha vida e por continuar fornecendo as bases que eu necessito para seguir minha carreira.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade, por ter me recebido como aluna de mestrado. Que possamos colher os frutos do trabalho que desenvolvemos juntos.

Agradeço a Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato, por estar sempre presente, desde o começo do meu trabalho, por oferecer sua ajuda sempre que necessário. Grande professora e grande pessoa, um exemplo para todos.

Agradeço a Profa. Dra. Christianne Pienna Soares, por abrir as portas para mim no Laboratório de Citologia, por ter feito parte da minha banca de qualificação e defesa, e sempre contribuir muito com os seus conselhos e observações sempre pertinentes.

Agradeço as meninas da farmácia Thaís Moreira e Juliana Sorbo, pelas várias vezes em que me ajudaram, sempre com muita paciência. Que vocês tenham muito sucesso, tenho certeza que irão longe.

Agradeço a Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, por ter permitido que minhas análises fossem feitas no Núcleo de Proteômica. E agradeço muito a Cláudia Tavares, pessoa maravilhosa que me ajudou a realizar e analisar a maioria dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, por tão gentilmente fornecer as linhagens celulares para que esse trabalho pudesse ser feito.

À Coordenação da Pós-Graduação do programa Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

Agradeço a agência de fomento CNPq, pela concessão da bolsa de Mestrado durante dois anos. Processo: 133801/2014-4.

Agradeço a minha avó Maria, vó Nair, vô Candoca e vô Bem (em memória), por sempre acreditaram em mim e celebrarem cada vitória minha, como se fossem de vocês.

Agradeço aos meus amigos, impossível citar todos os nomes, mas em especial à Carolzinha Mendes e Cá Lorenzetti, por terem me dado força nos momentos mais difíceis que enfrentei no mestrado. E também à Malu Monteiro, por seus inúmeros conselhos que sempre me fizeram seguir em frente e ver o lado bom de tudo.

Por fim, agradeço novamente aos meus pais e ao meu irmão por estarem do meu lado em todos os momentos, principalmente nos difíceis. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida.

“Quando um pássaro está vivo, ele come as formigas, mas quando o pássaro morre, são as formigas que o comem. Tempo e circunstâncias podem mudar a qualquer minuto. Por isso, não desvalorize ou machuque ninguém e nenhuma coisa à sua volta. Você pode ter poder hoje, mas, lembre-se: O tempo é mais precioso do que qualquer um de nós! Saiba que uma árvore faz um milhão de fósforos, mas basta um fósforo para queimar milhões de árvores. Portanto, seja bom. Faça o bem!”

Casalle N. Susceptibilidade de carcinoma espinocelular oral ao óleo essencial de *Melaleuca Alternifolia* e suas principais porções solúveis [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil – TTO) é composto por aproximadamente 100 componentes, sendo que os de maior concentração são o terpinen-4-ol e gama-terpineno. Os estudos da sua capacidade citotóxica têm demonstrado efeito sobre linhagens neoplásicas malignas. O objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade citotóxica e mutagênica do TTO e seus componentes, terpinen-4-ol e gama terpineno em culturas celulares. Duas linhagens de carcinomas espinocelulares orais e uma linhagem de ceratinócitos foram analisadas por: (1) Análise colorimétrica de Metiltetrazolium (MTT); (2) Teste do Micronúcleo. Os resultados foram expressos na forma de ensaios de susceptibilidade e grau de mutagenicidade. Posteriormente foram analisados por *one-way* Anova com pós-teste de Tukey. Os valores de IC₅₀ obtidos nas análises de MTT das células expostas ao TTO foram de 0,2% para a HaCaT, 0,14% para a HSC-3 e 0,17% para a SCC-25. Para a exposição ao terpinen-4ol, os valores de IC₅₀, foram 0,5%, 0,3% e 0,45% para as linhagens HaCaT, HSC-3 e SCC-25, respectivamente. O gama-terpineno, não demonstrou atividade citotóxica expressiva, não sendo possível calcular o IC₅₀. O TTO não demonstrou mutagenicidade nas linhagens HaCaT e HSC-3. O terpinen-4-ol, não foi capaz de produzir mutagenicidade em nenhuma das linhagens em estudo. Conclui-se que tanto o TTO quanto o terpinen-4-ol apresentam capacidade citotóxica sobre as linhagens HaCaT, HSC-3 e SCC-25. O TTO não foi mutagênico nas linhagens HaCaT e HSC-3. O terpinen-4-ol não foi mutagênico em nenhuma das linhagens testadas.

Palavras chave: Carcinoma de células escamosas. Óleo de melaleuca. Sobrevivência celular. Testes para micronúcleos.

Casalle N. Susceptibility of oral squamous cell carcinoma to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* and main soluble componentes [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016

ABSTRACT

The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil - TTO) consists of about 100 components, and the highest concentration are terpinen-4-ol and gamma-terpinene. Studies of their cytotoxic capacity have shown effect on malignant neoplastic lineages. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and mutagenic capacity of TTO and main soluble components, terpinen-4-ol and gama-terpinene in cell cultures. Two lineages of oral squamous cell carcinoma and a keratinocyte cell were analyzed: (1) colorimetric analysis Metiltetrazolium (MTT); (2) Micronucleus assay. The results were expressed as susceptibility tests and degree of mutagenicity. The statistical test used in the analysis was *one-way* ANOVA (Tukey test). The IC₅₀ values obtained from the MTT analysis of cells exposed to TTO were 0.2% for HaCaT, 0.14% for HSC-3, and 0.17% for SCC-25. For exposure to terpinen-4ol, IC₅₀ values were 0.5%, 0.3% and 0.45% for HaCaT, HSC-3 and SCC-25, respectively. The gamma-terpinene didn't show significant cytotoxic activity, therefore it was impossible to calculate the IC₅₀. The TTO was unable to produce mutagenicity in HSC-3 and HaCaT. The terpinen-4-ol was not mutagenic in any of the lineages tested. In conclusion, both the TTO and terpinen-4-ol had cytotoxic capacity on HaCaT, HSC-3 and SCC-25. The TTO was unable to produce mutagenicity in HSC-3 and HaCaT. The terpinen-4-ol was not mutagenic in any of the lineages tested.

Keyword: Carcinoma, Squamous cel. Tea tree oil. Cell Survival. Micronucleus tests.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise de variância

C- curcumina

CEC- carcinoma espinocelular

CIT-B- citocalasina B

CN – controle negativo

CP – controle positivo

CPA- controle positivo de apoptose

CPN- controle positivo de necrose

CV- controle de veículo

D- doxorrubicina

DMEM – dulbecco's modification of eagle's médium

DMSO- dimetilsulfóxido

EP - erro padrão

FITC - isotiocianato de fluoresceína

FS- fosfatidilserina

F12- nutrient mixture

HaCaT- Human Keratinocyte Cell

HSC-3- human oral squamous cell carcinoma

IC50 – concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular

IP – iodeto de propídio

M- média

MN- micronúcleo

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- brometo de difeniltetrazólio

PBS – solução salina tamponada com fosfato

p53- proteína p53

SCC-25- squamous cell carcinoma

SFB – soro fetal bovino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4 MATERIAL E MÉTODO.....	20
4.1 Óleo e Componentes do Óleo de <i>Melaleuca Alternifolia</i>.....	20
4.2 Linhagens Celulares.....	22
4.2.1 Carcinomas espinocelulares e ceratinócito imortalizado.....	22
4.2.2 Fase experimental das culturas celulares (CECs e HaCaT).....	22
4.3 Avaliação da Citotoxicidade em Culturas de Células.....	24
4.3.1 Análise colorimétrica de metiltetrazolium (MTT).....	24
4.4 Teste do Micronúcleo.....	26
4.5 In Cell Analyzer 2000.....	28
4.6 Forma de Análise dos Resultados.....	29
5 RESULTADO.....	30
5.1 Análise Colorimétrica de Metiltetrazolium (MTT).....	30
5.1.1 Resultados TTO e terpinen-4-ol.....	31
5.2 Teste do Micronúcleo.....	35
5.2.1 Resultados TTO.....	36
5.2.2 Resultados terpinen-4-ol.....	39
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, a cada ano, 14.1 milhões de novos casos são diagnosticados e 8,2 milhões de pessoas morrem devido à doença^{13, 9}. No Brasil, em 2016 serão 596 mil casos novos, 295 mil em homens e 300 mil em mulheres. É a segunda maior causa de morte, com 190 mil óbitos por ano^{13, 6}.

No ano de 2012, os cânceres de boca foram estimados em 300 mil casos novos, dos quais, dois terços foram do sexo masculino. Para o mesmo ano, a estimativa de óbitos foi de 145 mil casos, com cerca de 80% ocorrendo em regiões menos favorecidas^{13, 2}.

No Brasil, o câncer de cavidade oral está entre os 10 tumores malignos mais prevalentes. Em homens a estimativa para 2016 é de 11.140 casos (5,2%), sendo o quinto tumor maligno mais comum. Em mulheres serão 4.350 casos, sendo o 12º tumor maligno mais frequente¹³. Estes dados demonstram claramente a importância do estudo destes tumores, mais ainda quando comparamos sua prevalência relativa no Brasil e no mundo, respectivamente 2,4% e 2,1%⁹.

Por consequência, estudos tentam identificar novas opções de tratamento que possam melhorar a sobrevida dos pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de boca^{21, 19}. Neste contexto, foram realizados experimentos com substâncias de origem vegetal com o intuito de identificar novas drogas de potencial uso, como auxiliares ao tratamento atualmente preconizado^{5, 10}. De fato, novos quimioterápicos extraídos, originalmente de plantas continuam entrando no mercado e vem sendo analisados quanto a sua utilidade contra diferentes neoplasias, incluindo o carcinoma espinocelular.

A *Melaleuca alternifolia* é um fitoterápico que se destaca em diferentes estudos para fins medicinais. O óleo essencial de melaleuca (tea tree oil – TTO) é composto por uma complexa mistura de aproximadamente 100 componentes⁴, dos quais os componentes de maior concentração são o terpinen-4-ol (39-48%), gama-terpineno (17-18%) e alfa-terpineno (8-13%). O óleo é considerado não

tóxico de odor agradável, sendo utilizado largamente em produtos com finalidade reparadora ou anti-infecciosa. Sua capacidade lipofílica e consequente penetração na pele sugerem possibilidade de uso tópico ^{25, 17}.

A capacidade citotóxica do TTO e do terpinen-4-ol contra diferentes linhagens celulares malignas vem sendo avaliada ¹². Entretanto, não existem estudos que tenham analisado a capacidade citotóxica do TTO e seus componentes de maior concentração sobre linhagens celulares provenientes de carcinomas espinocelulares orais ou outros tumores malignos de boca. Sendo assim, consideramos importante o estudo destas substâncias sobre linhagem celular proveniente desta região.

Para tanto, alguns parâmetros podem ser avaliados em experimentos in vitro. Este trabalho avaliou dois deles. O primeiro relacionado com a possível alteração da atividade mitocondrial, que avaliou a viabilidade celular e norteou as concentrações necessárias para o próximo experimento (respiração oxidativa, ensaio de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo - MTT] ³. O segundo avaliou se o efeito citotóxico propiciou lesão nuclear, causando danos a nível cromossômico, essas mutações cromossômicas são fatores essenciais para a carcinogênese e foi analisado pelo teste de Micronúcleo.

7 CONCLUSÃO

- TTO reduziu a viabilidade celular em até 50%, sendo possível calcular o IC_{50} , nas três linhagens em estudo. O IC_{50} encontrado para a linhagem HaCaT foi de 0,2% e os IC_{50} das linhagens de carcinomas espinocelulares, HSC-3 e SCC-25 foram de 0,14% e 0,17%, respectivamente;

- O Terpinen-4-ol foi capaz de reduzir a viabilidade celular em até 50%, obtivemos o IC_{50} , nas três linhagens em estudo. Os valores de IC_{50} , das três linhagens foram :0,5% para a HaCaT, 0,3% para a HSC-3 e 0,45% para a SCC-25. O segundo componente mais concentrado no TTO, o gama-terpineno, não demonstrou atividade citotóxica expressiva, não sendo possível calcular seu IC_{50} .

- O TTO não apresentou mutagenicidade nas linhagens HaCaT e HSC-3.

- O terpinen-4-ol, não foi capaz de produzir mutagenicidade nas três linhagens (HaCaT, HSC-3 e SCC-25).

Referencias *

- 1 Banjerdpongchai R, Khaw-on P. Terpinen-4-ol induces autophagic and apoptotic cell death in human leukemic HL-60 cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14 (12): 7537-42.
- 2 BBC BRASIL [homepage da internet]. Dez gráficos que explicam o impacto do câncer no mundo. [citado 04/02/2016]. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese>.
- 3 Bozzuto G, Colone M, Toccaceli L, Stringaro A, Molinari A. Tea tree oil might combat melanoma. *Planta Med*. 2011; 77 (1): 54-6.
- 4 Brophy JJ, Craig DC, Goldsack RJ, Fookes CJ, Leach DN, Waterman PG. Triumphalone, a diketone from the volatile oil of the leaves of *Melaleuca triumphalis*, and its spontaneous conversion into isotriumphalone. *Phytochemistry*. 2006; 67 (18): 2085-9.
- 5 Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, et al. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2004; 122 (2): 349-60.
- 6 Cancer Today- International Agency for Research on Cancer: World Health Organization [homepage da internet]. Lion: Cancer Today- IARC- powered by Globocan 2012 [acesso em 18/08/2016]. Disponível em: <http://qco.iarc.fr/today/home>.
- 7 Doll-Boscardin PM, Sartoratto A, Maia BHLS, de Paula JP, Nakashima T, Farago PV, et al. In vitro cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012: 342652. doi: 10.1155/2012/342652.
- 8 Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000; 455 (1-2): 81-95.
- 9 Globocan 2012 - International Agency for Research on Cancer: World Health Organization [homepage da internet]; 2012. Lion: Globocan 2012- Estimated câncer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [acesso em 18/08/2016]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>.
- 10 Greay SJ, Ireland DJ, Kissick HT, Levy A, Beilharz MW, Riley TV, et al. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 65 (5): 877-88.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

- 11 Greay SJ, Ireland DJ, Kissik HT, Heenan PJ, Carson CF, Riley TV, et al. Inhibition of established subcutaneous murine tumors growth with topical *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 66: 1095–102.
- 12 Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44 (5): 616-25.
- 13 INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de prevenção e vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [homepage da internet]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer; [acesso em 2016]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
- 14 Ireland DJ, Greay SJ, Hooper CM, Kissick HT, Fillion P, Riley TV, et al. Topically applied *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil causes direct anti-cancer cytotoxicity in subcutaneous tumour bearing mice. *J Dermatol Sci*. 2012; 67(2): 120–9.
- 15 Khaw-on P, Banjerdpongchai R. Induction of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in the human leukemic MOLT-4 cell line by terpinen-4-ol. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2012; 13: 3073-6.
- 16 Krifa M, Mekdad HL, Bentouati N, Pizzi A, Ghedira K, Hammami M, et al. Immunomodulatory and anticancer effects of *Pituranthos tortuosus* essential oil. *Tumor Biol*. 2015; 36: 5165–70.
- 17 Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic candida species. *BMC Infect Dis*. 2006; 6:158.
- 18 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1-2): 55-63.
- 19 Nwizu T, Ghi MG, Cohen EE, Paccagnella A. The role of chemotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol*. 2012; 22 (3): 198-20.
- 20 Oliveira ACM, Fontana A, Negrini TC, Nogueira MNM, Bedran TBL, Andrade CR, et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. *Rev Bras Pl Med*. 2011; 13 (4): 492-99.
- 21 Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. *Lancet*. 2000; 355: 949-55.

- 22 Schmid I, Uittenbogaart C, Jamieson BD. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. *Nat Protoc.* 2007; 2 (1): 187-90.
- 23 Shapira S, Pleban S, Kazavov D, Tirosh P, Arber N. Terpinen-4-ol: a novel and promising therapeutic agent for human gastrointestinal cancers. *PLoS One.* 2016; 11 (6): e0156540 doi: 10.1371.
- 24 Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175 (1): 184-91.
- 25 Walton SF, McKinnon M, Pizzutto S, Dougall A, Williams E, Currie BJ. Acaricidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: in vitro sensitivity of *sarcoptes scabiei* var *hominis* to terpinen-4-ol. *Arch Dermatol.* 2004; 140 (5): 563-6.
- 26 Wu CS, Chen YJ, Chen JJW, Shieh JJ, Huang CH, Lin OS, et al. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 818261. doi: 10.1155/2012/818261.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 30 de setembro de 2018.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 30 de setembro de 2016.

NICOLE CASALLE