AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Pogostemon cablin* Benth EM CÉLULAS A549.

Maria Domenica Christiano Nadal (PIBIC), Carla Cristine Kanunfre (Orientadora),
E-mail: madocn@gmail.com, e-mail da orientadora: cckanunfre@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral.

Fisiologia 2070000-8, Fisiologia Geral 2070100-4.

Palavras-chave: Câncer de Pulmão, Óleo Volátil, Patchouli, Viabilidade Celular.

Resumo

As plantas aromáticas possuem em sua composição os óleos essenciais (OE), que pela alta volatilidade e lipossolubilidade podem ser empregado pela via inalatória para o tratamento do câncer de pulmão. O objetivo deste projeto foi de avaliar a citotoxicidade da fase vapor do OE de *Pogostemon cablin* Benth (patchouli) em células de carcinoma de pulmão (A549). Utilizando-se os ensaios de redução do MTT e coloração com sulforodamina B (SRB), foi determinada a viabilidade celular. A fase vapor do OE foi citotóxica de maneira dose e tempo-dependente. A concentração citotóxica que gerou morte de 50% das células (CI_{50}) no período de 72 horas correspondeu à 257 µg/ml (MTT) e à 314 µg/ml (SRB). Empregando os resultados dos ensaios de redução do MTT e SRB do período de 72 horas de tratamento, foi calculado o índice de seletividade (IS) de 3,1 e 2,3. Estes valores são sugestivos de que a fase vapor do OE de Patchouli apresenta potencial para seu emprego como antitumoral.

Introdução

O câncer é uma doença multifatorial com o crescimento descontrolado e invasão de células anormais que conduzem à formação de tumor. O carcinoma de pulmão está entre os cânceres mais comuns e letais, com baixo índice de sobrevivência, sendo o tratamento realizado através de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (INCA, 2014). Tratamentos complementares e alternativos, utilizando-se óleos essenciais (OE), podem constituir-se em uma nova modalidade terapêutica (MACHADO & FERNANDES JUNIOR, 2011).

Os OE são produtos aromáticos de metabolismo secundário de plantas, normalmente produzidos por células secretoras ou grupos de células, sendo encontrados em diversas partes do vegetal. Todavia são comumente concentrados nas folhas, casca ou frutos (SIMÕES & SPIZTER, 1999). Devido a composição, os OE possuem diversas propriedades farmacológicas, grande parte em função de sua volatilidade (GAUTAM *et al*., 2014).

O OE de *Pogostemon cablin* Benth. (Patchouli) possui diversas atividades biológicas, como ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, cicatrizante, antisséptica, neuroprotetora, anti-influenza e anti-helmíntica (SOBRAL *et al*., 2014).

Quimicamente este OE é caracterizado por apresentar compostos sesquiterpenos, onde o seu principal componente é o patchoulol (RAMYA *et al.*, 2013).

Lu *et al.* (2016) relataram que o patchoulol exerce efeito antitumoral contra o câncer de pulmão, induzindo células A549 a morte por apoptose. Todavia os efeitos dos da fase vapor deste OE ainda não foram estudados quanto ao seu potencial antitumoral.

Os efeitos da fase vapor do OE de patchouli encontram-se apenas relatado pelo seu emprego na aromoterapia, onde o OE de patchouli é usado para controlar o apetite, aliviar a depressão e o estresse. Segundo os pesquisadores doses altas do OE podem estimular o sistema nervoso e em doses baixas tem efeito sedativo, sendo também utilizado para melhorar a concentração e aprimorar a inteligência (SHANKARANARAYAN, 2002).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial antitumoral dos compostos voláteis (fase vapor) do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth (patchouli) em células de carcinoma de pulmão (A549), comparando-as com as células controle/normais MRC-5.

Material e Métodos

A linhagem celular A549 é derivada de um carcinoma de pulmão humano caracterizada por ser do tipo de células não pequenas, que foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), sendo cultivada conforme recomendado. As células foram mantidas em meio DMEM, contendo soro fetal bovino(SFB) a 10% e as culturas foram mantidas em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de CO2 a 5%. Foi utilizado neste trabalho também, a linhagem MRC-5 como controle. Essa é uma célula normal, caracterizada como fibroblasto de pulmão humano, que foi adquirida do Instituto Adolfo Lutz (IAL). A linhagem foi mantida em meio MEM, contendo 15% de SFB nas mesmas condições das células A549.

As duas linhagens de células utilizadas (MRC-5 e A459), foram semeadas em placas de 24 poços em 1 ml de meio de cultura na concentração de 3 X 10^4 células/ml, nos oito poços centrais por placa, conforme protocolo estabelecido por Seal *et.al*.(2012) com modificações. Nos 16 poços restantes, que estavam desprovidos de células, foi feita a inserção do Óleo Essencial (OE) de Patchouli disperso em solução salina (NaCl 0,9%). Para solubilização do OE na salina foi utilizado como veículo uma mistura constituída de 25% de Propilenoglicol e 75% de Etanol PA. As células foram incubadas por 24 horas para a completa adesão celular, e após esse período foram realizados os tratamentos com o vapor do OE pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. Ao todo foram testadas 5 concentrações da fase vapor do OE a partir das dispersões de 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/ml para ambas as linhagens celulares, além do controle, que foi feito apenas com solução de salina e veículo.

Para determinação da citotoxicidade foi avaliado a viabilidade celular das células A549 e MRC-5 por 2 ensaios diferentes: (1) Ensaio de redução do 3- (4,5 dimetiltiazol-2yl) -2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MTT), realizado conforme descrito por MOSMANN (1983). Este ensaio permite de maneira indireta a avaliação do metabolismo celular; (2) Ensaio de coloração de proteínas empregando-se a sulforodamina B (SRB), conforme descrito por PAPAZISIS et.al.(1997).

Após determinada a viabilidade celular foi calculado: (1) A concentração da fase vapor do OE que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) no período de tratamento de 72 horas; (2) O Índice de Seletividade (IS) foi calculado pela razão entre o CI_{50} de células controle/normais (MRC-5) e células tumorais (A549).

Os resultados foram normalizados em relação ao controle e análisados pelo programa estatístico *Graph Pad Prism* (versão 5), empregando-se a análise de

variância ANOVA de uma via, seguido do pós teste Tukey. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. Para determinação do CI_{50}, foi utilizado programa *StatPlus* (versão 5.9.8), empregando-se análise de sobrevivência pela regressão de Probit, pelo Método de Finney.

Resultados e Discussão

Devido a sua composição os OE apresentam uma fase vapor e, em função da volatilidade das substâncias componentes, tornando-os ideais para nebulizações e inalações (BANDONI & CZEPAK, 2008). Pensando-se em câncer de pulmão essa via de administração poderia ser bastante interessante.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o vapor de OE de Patchouli possui efeito citotóxico sobre as células tumorais de pulmão A549, efeito que também foi observado para células normais de pulmão MRC-5, todavia com menor atividade. O efeito citotóxico observado caracterizou-se dose e tempo-dependente para ambas as linhagens.

As células MRC-5, que são células normais de pulmão humano foram utilizadas como células controle, como objetivo de comparar a citotoxicidade da fase vapor do OE de patchouli com as células A549.

Os resultados da concentração da fase vapor do OE que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) para ambas as linhagens de células estão demonstrados na Tabela 1. Foi possível observar que em relação às células controle, as células tumorais apresentaram um menor valor de CI_{50}, o que confere ao vapor do OE de patchouli uma maior toxicidade para as células tumorais. Os valores de CI_{50} diferiram estatisticamente entre as linhagens ($p<0,05$). Após realização do cálculo do índice de seletividade (razão da CI_{50} entre células controle e células tumorais), pode-se notar que tanto para o método de MTT quanto para o SRB, obteve-se valores maiores que 2, significando que a fase vapor do OE apresenta um possível potencial para antitumoral.

Tabela 1 – Concentração Inibitória de 50% da viabilidade celular (IC_{50}) e o Índice de Seletividade (IS) para a fase vapor do OE de Patchouli em células MRC-5 E A549. Os resultados estão expressos como a média e erro padrão da média.* Representa diferença estatística de $p<0,05$ entre A549 comparada com MRC-5.

Linhagens de Células	CI50 (µg/ml - 72horas)		Índice de Seletividade (IS)
	MTT(72h)	SRB (72h)	
MRC-5	794,05 +/- 129,26	718,49 +/- 260,09	MTT = 3,1
A549	256,69 +/- 37,99 *	313,71 +/- 44,18 *	SRB = 2,3

Gautam *et al*., (2014) em seu trabalho de revisão relatou a existência na literatura de muitos estudos que evidenciam atividade antitumoral dos OE e seus constituintes. De fato, pesquisas *in vitro* e *in vivo* têm mostrado resultados efetivos dos OE, das mais diversas espécies vegetais, contra câncer de boca, pulmão, mama, próstata, fígado, colón, cérebro e leucemias. Porém somente Seal *et al*., (2012) até então tinham relatado o efeito da fase vapor de OE *Litsea cubeba* como antitumoral frente as células A549 e observaram indução de apoptose, cujo processo de morte foi atribuído à regulação da proteína p53 que atua como supressora de tumor. Segundo os resultados de Maeda (2016), do nosso grupo de pesquisa, o

vapor de OE de *Pogostemon cablin* também induziu a morte das células Calu-3 por apoptose.

Conclusão

O presente estudo gerou evidências de que os tratamentos com a fase vapor do OE de Patchouli foram citotóxico de maneira dose e tempo-dependente para células tumorais A549, apresentando uma IC_{50} estimada menor quando comparado com as células controle/normal MRC-5, que é sugestivo de que a fase vapor apresenta potencial antitumoral.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica e a UEPG pela infraestrutura de pesquisa.

Referências

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

INCA (2014). Tipos de câncer: pulmão. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>.

LU, X. G et al., Molecular role of EGFR-MAPK pathway in patchouli alcohol-induced apoptosis and cell cycle arrest on a549 cells in vitro and in vivo. BioMed Research International. v. 2016, Article ID 4567580, 12 pages, 2016.

MACHADO, B.; FERNANDES, A. Óleos essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MAEDA, L.E. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL de *Pogostemon cablin* Benth. EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÃO - CALU-3. **Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do título de Bacharel em Farmácia na Universidade Estadual de Ponta Grossa;** p.1-47**,** 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal Immunology Methods,** v. 65, n 1-2, p. 55-63, 1983.

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

RAMYA, H. G. *et al.* An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) – A medicinal and aromatic plant: It's importance to mankind. **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, v. 15, n. 2, p. 243-250, 2013.

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. e47014, 2012.

SHANKARANARAYAN, V. Patchouli constituents and its usage in perfumery. **Indian Perfumer**, v. 46, p.313-314, 2002.

SIMÕES, CM. & SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. Farmacognosia. da planta ao medicamento. Porto Alegre/ Florianópolis. Ed. UFRGS/UFSC, p. 387-415, 1999.

SOBRAL, M. V. *et al.* Antitumor Activity of Monoterpenes Found in Essential Oils. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-35, 2014.