EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN ET CAMBAGE SOBRE FIBROBLASTOS 3T3

Leticia Castro Neves (PIBIC/FA), Patrícia Mathias Döll Boscardin (orientadora), pattydoll@globo.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa / Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Farmácia, Farmacognosia.

Palavras-chave: Citotoxicidade, óleo essencial, *Eucalyptus benthamii*

Resumo

Eucalyptus benthamii Maiden et Cambage é uma espécie promissora para reflorestamento na região Sul do Brasil. São escassos estudos sobre atividades biológicas produzidas pelo óleo essencial dessa espécie, o qual é extraído das folhas. O presente trabalho buscou avaliar a atividade do óleo essencial desse eucalipto sobre fibroblastos 3T3. Para isto foi utilizado o ensaio de redução do MTT. O material botânico foi coletado na Fazenda de Transferência de Tecnologia da Embrapa Florestas em Ponta Grossa, Paraná. E o óleo essencial foi extraído a partir do processo de hidrodestilação. O óleo essencial de E. benthamii diminuiu a viabilidade dos fibroblastos 3T3 nas maiores concentrações (100 e 30 µg/mL) e aumentou significativamente a quantidade de fibroblastos 3T3 quando esta linhagem celular foi tratada com as menores concentrações do óleo essencial (30, 10 e 3 µg/mL), indicando um incremento na proliferação celular.

Introdução

As civilizações antigas já utilizavam plantas para tratamento de diversas doenças, mesmo sem conhecer a existência de microrganismos e o funcionamento do corpo humano. À partir de observações empíricas, nossos ancestrais dominaram aos poucos os conhecimentos sobre plantas medicinais e esses conhecimentos eram passados entre gerações. Hoje, o conhecimento sobre a utilização de diversas espécies vegetais com finalidade terapêutica já está consolidado em bases científicas. Os estudos das espécies vegetais e seus compostos, permitiram a descoberta de muitos metabólitos com finalidade terapêutica, cosmética, entre outras. A caracterização química possibilita a identificação de atividades biológicas, servindo de base para síntese e semi-síntese de compostos utilizados em cosméticos e medicamentos (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Os óleos essenciais são utilizados desde a antiguidade devido às suas propriedades aromáticas. São substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, com função de proteção contra predadores ou microrganismos prejudiciais ao seu crescimento, atrair polinizadores, inibir o desenvolvimento de outras plantas, controlar temperatura e a perda de água. Os óleos voláteis, outra denominação dos óleos essenciais, são utilizados na produção de cosméticos, medicamentos, domissanitários, entre outros produtos (BUCHBAUER et al., 1993).

Dentre os milhões de hectares de florestas plantados no Brasil, mais da metade corresponde ao gênero *Eucalyptus* spp. Parte significativa desse plantio, é destinado às indústrias madeireiras e de produção de celulose (AGRONLINE, 2008). As folhas de eucalipto são a matéria-prima de onde é extraído o óleo essencial.

ISSN 1676-0093

Eucalyptus é um gênero pertencente à família Myrtaceae, que inclui cerca de 900 espécies e subespécies (BROOKER; KLEINIG, 2006). Essas árvores são nativas da Austrália e a maior parte cresce naturalmente. Atualmente, esse gênero está distribuído mundialmente. A introdução desse grupo botânico em tantos países pelo mundo se deve à alta resistência à diversidade climática e de temperaturas, ocorrendo tanto em áreas tropicais quanto em áreas de temperaturas mais frias. (COMMONWEALTH OF AUSTRALIA, 1962).

A espécie *Eucalyptus benthamii* Maiden *et* Cambage é uma árvore originária da Austrália. É uma das espécies mais utilizadas em regiões de reflorestamento no Sul do Brasil. É resistente ao frio, suporta temperaturas de até – 6°C e possui alta capacidade de rebrota (LIMA, 2009; HIGA, 1999). Em estudos realizados por Silva, Brito e Silva Júnio (2006) verificou-se presença de α-pineno, principal terpeno constituinte do óleo essencial de *E. benthamii,* associado à atividade antibacteriana e inseticida.

Essa espécie foi introduzida no Brasil pela Embrapa Florestas no ano de 1988, em Colombo, no Paraná. Em plantios experimentais, a espécie tem apontado rápido crescimento, alta resistência a geadas, boa forma de fuste e alta homogeneidade do talhão (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999). Essas características tornam a espécie promissora como opção para reflorestamento em regiões nas quais ocorrem geadas frequentes e severas, como no sul do Brasil. Em estudo realizado com representantes de *Eucalyptus*, *E. benthamii* tem sido a espécie de crescimento mais acelerado do gênero (HIGA; CARVALHO, 1990). Por todas essas razões, essa espécie tem sido de grande importância para o ciclo da madeira.

São escassas as pesquisas com abordagens fitoquímicas e/ou medicinais a partir de óleos essenciais ou de extratos obtidos de *E. benthamii*. Silva, Brito e Silva Júnior (2006) investigaram o potencial de algumas espécies de eucalipto para obtenção de essência. Döll-Boscardin (2012) realizou análises fitoquímicas de *E. benthamii*, à partir de extrações de óleo essencial de folhas e obteve concentrações de 0,35 e 0,4% de óleo essencial, onde o constituinte majoritário foi α-pineno. O presente trabalho buscou avaliar a atividade do óleo essencial desse eucalipto sobre fibroblastos 3T3.

Material e Métodos

Coleta do material botânico

A coleta do material botânico foi realizada na Fazenda de Transferência de Tecnologia da Embrapa. Foram selecionadas árvores de *Eucalyptus benthamii* Maiden *et* Cambage para efetuar as coletas das folhas.

Extração do óleo essencial

As folhas foram estabilizadas para extração do óleo essencial por hidrodestilação. O processo de hidrodestilação foi mantido durante 6 horas utilizando aparelho Clevenger. Após esse período, o material obtido foi armazenado em tubos de vidro âmbar, selados, em temperatura de 4 ± 0,5ºC.

Cultivo celular

O cultivo celular foi feito utilizando fibroblastos 3T3 e meio de cultivo DMEM suplementado com 10 % soro fetal bovino. Utilizou-se antibióticos de amplo espectro para evitar contaminação microbiológica. Utilizou-se bicarbonato de sódio para ajuste de pH. As células foram cultivadas em garrafa e mantidas 37° C em estufa umidificada com 5% de CO_2.

Aplicação do óleo essencial de E. benthamii

Após crescimento celular em quantidade adequada, foi feito plaqueamento dos fibroblastos em placa de 96 poços. Incubou-se por 24 horas em estufa umidificada

com 5% de CO_2 à 37ºC para fixação das células na placa. Para aplicação, fez-se diluição do óleo essencial para concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 µg.mL^{-1}. Também foram aplicados somente meio DMEM como controle.

Ensaio de redução do MTT

O método MTT determina a capacidade das células reduzirem o sal solúvel brometo 3-(4,5)dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico formando cristais insolúveis de formação com coloração violeta. Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se uma solução de MTT a 0,5 mg.mL^{-1} nos poços contendo células. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37ºC durante 30 min e ao abrigo da luz, envolvias por papel alumínio. Para a solubilização dos cristais de formazan, produto da redução do MTT, o dimetilssulfóxido (DMSO) foi adicionado e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 550 nm, foi realizada em leitor de placas.

Resultados e Discussão

Durante o processo de extração por meio do aparato de Clevenger, foi observado que o óleo essencial extraído de folhas de *E. benthamii* possui uma densidade menor do que a densidade da água, uma coloração amarelo claro e um odor característico, bastante pronunciado.

Em relação ao ensaio de redução do MTT, foi verificado que o óleo essencial pode ser citotóxico aos fibroblastos como também pode aumentar a viabilidade celular. O óleo essencial diminuiu a viabilidade dos fibroblastos 3T3 nas maiores concentrações (100 e 30 µg/mL) e aumentou significativamente a quantidade de fibroblastos 3T3 quando esta linhagem celular foi tratada com as menores concentrações do óleo essencial (30, 10 e 3 µg/mL). Como demonstrado no gráfico.

Efeito do óleo essencial de *E. benthamii* em fibroblastos 3T3

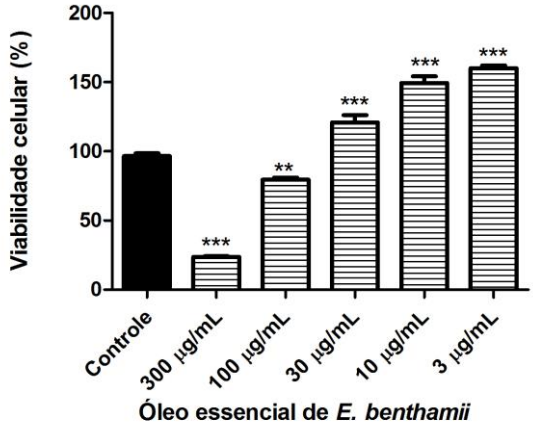


Gráfico 1: Os resultados estão expressos como média ± EPM (erro padrão da média) (n=8). O teste estatístico utilizado foi o teste *post-hoc* de Tukey. ***p< 0,001 quando comparado com o grupo controle; **p< 0,01 quando comparado com o grupo controle.

Buscamos, com essa análise informações em relação ao comportamento biológico do óleo essencial, para que possa ser utilizado posteriormente em estudos *in vivo*. A avaliação da citotoxicidade fornece um parâmetro de segurança na utilização de compostos com potencial atividade terapêutica (YAMAGUCHI et al., 2013).

Figueiredo e colaboradores (2018) também observaram que altas concentrações do óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth tem efeito citotóxico sobre fibroblastos, enquanto que menores concentrações podem ser utilizadas com finalidade terapêutica. Estabelecer esse limite entre citotoxicidade e atividade terapêutica é fundamental para realização de estudos *in vivo.*

Conclusão

Com os resultados obtidos, conclui-se que houve aumento de até 50% na proliferação celular dos fibroblastos 3T3, quando foram utilizadas baixas concentrações (30, 10 e 3 µg/mL) do óleo essencial de *E. benthamii.* Contudo, altas concentrações do óleo essencial causaram efeito citotóxico na linhagem celular testada, diminuindo a viabilidade celular em mais de 50% (300 µg/mL).

Agradecimentos

À querida orientadora Drª Patrícia Mathias Döll Boscardin que me proporcionou novos aprendizados e uma nova área de pesquisa, os quais fortaleceram meus conhecimentos técnicos e científicos.
À Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos.
À UEPG pela oportunidade de participar do programa de Iniciação Científica, o qual me permitiu ampliar meu olhar para áreas de pesquisas científicas.

Referências

ANDRADE, E. N.; VECCHI, O. **Os Eucaliptos: sua cultura e exploração**. São Paulo: Typographia Brazil de Rothschild ; Comp., 1918, 225 p.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M. (2009). **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage-Myrtaceae**.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M. (2012). **Avaliação anti-inflamatória e citotóxica do óleo essencial de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage.**

BROOKER, M. I. H.; KLEINIG, D. A. **Field Guide to Eucalyptus**. 3.ed. Melbourne: Bloomings, 2006.

BUCHBAUER, G.; JIROVETZ L.; JAGER, W.; PLANK, C.; DIETRICH, H. **Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation**. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 82, p. 660-664, 1993.

COMMONWEALTH OF AUSTRALIA. **Forest trees of Australia**. 2ª ed. Canberra: Commonwealth Government Printer, 1962, 230 p.

DA CRUZ MONTEIRO, S., & BRANDELII, C. L. C. (2017). ***Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação***. Artmed Editora.

DE FIGUEIREDO, D. N. et al. (2018). **Avaliação da atividade moduladora e citotóxica do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* Benth**. Revista Ciencias de la Salud, 16(1).

GRAÇA, M. E. C.; SHIMIZU, J. Y.; TAVARES, F. R. **Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii***. Boletim de Pesquisa Florestal, v. 39, p. 135-138, 1999.

HIGA, R. C. V. **Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. Boletim de Pesquisa Florestal, n. 38, p. 121-123, 1999.

LIMA, E. A. ***Eucalipto benthamii* – uma alternativa energética para áreas de ocorrência de geadas severas**. Painel Florestal. Disponível em: < http://painelflorestal.com.br/exibeNews.php?id=410;cod_editoria=4;url_back=news.php;pag=0;busca=> Acesso em: 20 de jul. 2009.

YAMAGUCHI, K. K. L., et al. (2013). **Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma Lauraceae rica em geranato de metila**. *Quimica Nova*, *36*(6), 826-830.