Avaliação in vitro da atividade antitumoral do óleo essencial de *Ocotea porosa* (Nees & Mart) Barroso.

Kennon Rios Santos (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Libardone José Ribeiro Brustulim, Jane Manfron Budel, Katia Sabrina Paludo (Orientador), e-mail: e-mail do orientador.
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento do Orientador.

2.06.00.00-3 Morfologia, 2.06.01.00-0 Citologia e Biologia Celular.

Palavras-chave citotoxicidade, apoptose, cultivo celular.

Resumo

O Brasil carece de estudos sobre sua fauna e flora, muitos produtos derivados de fontes naturais vêm sendo estudados e utilizados como fonte de extratos e moléculas com potencial terapêutico. A espécie *Ocotea porosa,* pertencente à família Lauraceae, é uma planta nativa da América do Sul, pouco investigada em sua atividade anticâncer, considerando que espécies dessa família e gênero, em especial, são utilizadas amplamente na medicina popular. Objetivando analisar os efeitos citotóxicos do óleo essencial de *O. porosa* e possíveis alterações morfológicas induzidas em células de linhagens de melanoma murino (B16F10), fibroblasto murinho (McCoy) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), foram realizados ensaios de citotoxicidade e microscopia ótica para averiguar a viabilidade celular e as alterações morfológicas induzidas pelo óleo. O IC50 encontrado para as linhagens foi: 9,23 μg/mL (McCoy), 8,82 μg/mL (B16F10) e 185,4 μg/mL (MCF-7). Foram encontradas alterações morfológicas compatíveis com processo de morte celular por apoptose. O baixo IC50 encontrado para a linhagem B16F10 justifica a continuação dos estudos com o óleo de *O. porosa* para atividade anticâncer.

Introdução

Plantas da família Lauraceae são amplamente utilizadas na medicina popular, desempenhando diferentes funções contra várias doenças e o gênero *Ocotea* apresenta o maior número de espécies medicinais (FILHO et al, 2015).

Das 350 espécies desse gênero a maior parte está distribuída na região neotropical (MABBERLEY, 1997). Essas plantas são utilizadas com frequência para o tratamento úlceras, picadas de cobra, diarreias, neuralgia, indigestão e dores em geral, além de demandas econômicas e ecológicas (COUTINHO et al, 2006). Em espécies analisadas constituintes deste gênero, são encontrados compostos da família dos terpenos, presentes em óleos essenciais extraídos de diferentes regiões das plantas (TAKAKU et al, 2007). Os terpenos são metabólitos secundários encontrados em diferentes produtos naturais, constituem o maior grupo de fitoquímicos naturais, apresentam grande abrangência de utilidades como anti-inflamatórios, analgésicos, antipiréticos, cardiotônicos e em alguns estudos exibe citotoxicidade em linhagens celulares e vem recebendo destaque como potenciais agentes inibidores de proliferação celular (FERREIRA, 2014).

A espécie *Ocotea porosa*, também conhecida como imbuia, canela-imbuia, canela-preta ou canela-broto, é nativa da região Sul do Brasil, encontra-se em

regiões de sub-bosque de florestas de Araucárias, mas também se encontra em áreas mais abertas (LORENZI, 2008).

Tendo em vista a importância do uso medicinal do gênero *Ocotea* e a ausência de estudos anti-câncer da espécie *O. porosa*, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos citotóxicos *in vitro* do óleo essencial de *Ocotea porosa* (Nees & Mart) Barroso.

Materiais e Métodos

Coleta do óleo essencial e linhagens celulares.

O material botânico utilizado foi coletado no município de União da Vitória, Estado do Paraná. O método de extração do óleo essencial a partir das folhas foi a hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger. As linhagens de células utilizadas foram a de fibroblasto murino (McCoy, ATCC® CRL-1696™), melanoma murino (B16F10, ATCC® CRL-6475™) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7, ATCC® HTB-22™). Todas as linhagens foram crescidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100 mg/L) e penicilina (100 UI/L) mantidas a 37ºC, sob atmosfera de 5% de CO_2.

Ensaio de Citotoxicidade com MTT.

As células foram adicionadas em placas de 96 poços, acrescidas de meio RPMI. Após 24 h o meio RPMI foi retirado e aos poços com as células foram acrescentadas concentrações decrescentes do óleo essencial (7.700, 770, 77, 7,7 e 0,77 µg/mL) diluído em RPMI. Após 72 h o tratamento foi retirado e as células foram incubadas com 100µL de uma solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio, 5µg/mL). Depois de 2 h o excesso de MTT foi removido e foi acrescentado álcool isopropílico ácido para dissolver os cristais de formazan. A cor formada foi mensurada em 550 nm em leitor de microplacas. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos três vezes. O controle foi realizado em poços contendo as células, mas sem a adição do óleo.

A porcentagem de células viáveis foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: %viabilidade = (média da absorbância dos poços tratados – absorbância do branco) *100 / (média da absorbância dos poços controle – absorbância do branco), sendo considerado 100% a média da absorbância dos controles negativos.

Cálculo do IC50 e índice de seletividade (IS).

Por meio de uma curva de regressão linear, onde o eixo x representa a concentração de tratamento e o eixo y a porcentagem de viabilidade celular encontrada, foi possível calcular a concentração do óleo de *O. porosa* capaz de inibir 50% da viabilidade celular (IC50). Essa concentração foi obtida usando o programa GraphPad Prisma, versão 7.00. Após esse resultado foi calculado o IS (índice de seletividade), uma razão entre o IC50 de células normais e as células tumorais, para poder determinar a seletividade do óleo por células tumorais.

Análise morfológica.

Foram feitas análises morfológicas das células na concentração de 77µg/mL. As células (5.000) foram plaqueadas sobre lamínulas redondas estéreis depositadas no fundo dos poços de placas de 24 poços. Após 24 h foram tratadas com o óleo de *O. porosa* na concentração citada acima. Depois de 24 h de tratamento, foram lavadas com RPMI e fixadas com formol 2% em solução salina tamponada (PBS)

por 10 minutos. Depois de fixadas as células foram coradas com o corante hematológico May-Grünwald-Giemsa e as alterações morfológicas observadas em microscopia convencional utilizando objetiva de imersão.

Análise estatística.

Os dados foram submetidos aos testes de distribuição normal Shapiro-Wilk e Bartlett e posteriormente analisados por ANOVA de uma via e pós teste de Tukey, com nível de significância de $p<0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism (versão 5.01, San Diego, Califórnia, EUA).

Resultados e Discussão

O óleo essencial extraído das folhas de *O. porosa* foi capaz de reduzir a viabilidade celular de todas as linhagens testadas (figura 1). A redução de viabilidade foi significativa nas concentrações de 7.700 a 7 µg/mL em relação ao controle. Especula-se que a citotoxicidade encontrada se deve principalmente aos terpenos que podem estar presentes nesta espécie do gênero *Ocotea*, comumente encontrado em outras plantas desse gênero segundo Takaku et al (2007).

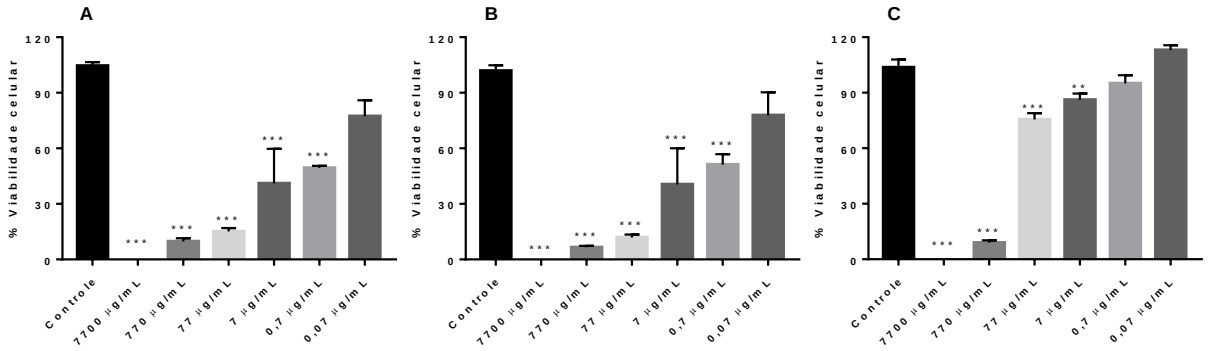


Figura 1. Viabilidade celular após 72 horas de exposição à diferentes concentrações do óleo de *O. porosa* pelo método do MTT. A – McCoy, B – B16F10, C – MCF-7. Cada barra representa a média ± o erro padrão da média de 3 experimentos diferentes realizados em quadruplicata. ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. Foi considerado significativo p<0,05. *p<0,05, ** p<0,01 e ***p<0,001.

A partir dos resultados de citotoxicidade, foram obtidos os dados de IC50 para todas as linhagens: 9,23 µg/mL (McCoy), 8,82 µg/mL (B16F10) e 185,4 µg/mL (MCF-7). O resultado encontrado demonstra maior atividade citotóxica nas linhagens McCoy e B16F10 que para as células MCF-7. Os valores de IS obtidos foram: 1,05 (B16F10) e 0,05 (MCF-7). Resultados menores do que 2 demonstram ação inespecífica do óleo para as células neoplásicas em relação a não neoplásica. Ayesh, Abed e Faris (2014) sugerem que para um composto ser considerado de baixa toxicidade e com boas chances de ser uma nova droga anticâncer, deve apresentar um IS superior a 2.

Considerando os resultados anteriores é possível perceber que o óleo de *O. porosa* foi citotóxico para as linhagens testadas. Com o objetivo de evidenciar qual o processo de morte celular pode estar envolvido na citotoxicidade induzida pelo óleo de *O. porosa*, foi realizado um ensaio de análise morfológica. O óleo de *O. porosa* foi capaz de induzir alterações morfológicas características de um processo de morte celular por apoptose, como formação de *blebs,* condensação de cromatina e

arredondamento celular (MEER ET AL, 2010). As imagens não foram apresentadas devido ao limitado espaço destinado ao resumo.

Conclusões

O óleo essencial de *O. porosa* apresentou maior citotoxicidade nas linhagens de células não neoplásicas (McCoy) e neoplásicas (B16F10). Para que a viabilidade destas linhagens diminuísse em 50% foi necessária, respectivamente, uma concentração de 9,23 µg/mL e 8,82 µg/mL de óleo essencial, já para a linhagem MCF-7 (adenocarcinoma humano) foi necessária uma concentração maior para que o IC50 seja atingido, correspondendo a 185,4 µg/mL. As células incubadas com o óleo apresentaram alterações compatíveis com processo de apoptose celular. O baixo IC50 encontrado para a linhagem de melanoma justifica a continuação dos estudos com o óleo essencial de *O. porosa*.

Agradecimentos

Agradeço a instituição UEPG pela estrutura, a Pós-Graduação de Odontologia e agradeço aos colegas de laboratório por todo o auxílio prestado.

Referências

AYESH, B.M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. In vitro inhibition of human leukemia HP-1 cells by Origanum syriacum L. and Thymus vulgaris L. extracts. **BMC Res Notes**, 7 (2014), p. 612.

COUTINHO, D. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BASÍLIO, I. J. L. D. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroideae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 16, v. 2, p. 178-184, 2006.

FILHO, O. A. A.; FERNANDES, H. M. B.; ASSIS, T. J. C. F. Luraceae's Family: a brief review of cardiovascular effects. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research**. 7: 22-26, 2015..

LORENZI H. 2008. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 5.ed. São Paulo: Instituto Plantarum. 384p.

FERREIRA, M. D. L. **Terpenos: Potenciais agentes quimioterapêuticos obtidos de fontes naturais usados contra o câncer de pulmão**. Projeto de pesquisa (graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Paraná. João Pessoa. 2014.

MEER, F. J. VAN DER. Apoptosis and necrosis induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers Med Sci**, v. 25, p.259–267. 2010.

TAKAKU, A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde. **Biochem Syst Ecol**. n. 25, p. 525-532, 2007.

MABBERLEY, D. J.; 1997. **The plant Book**. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press**.**