AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE *EUGENIA INVOLUCRATA*.

Kizzy Simão dos Santos Rocha(PIBIC/CNPq), Wagner Ozório D'Almeida, Jane Manfron Budel, Katia Paludo(Orientadora), e-mail: katiapaludo@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de biologia estrutural, molecular e genética

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

Palavras-chave: Cereja-do-mato, citotoxidade, B16F10.

Resumo

A cerejeira-do-rio-grande (*Eugenia involucrata*) é nativa do Sul do Brasil, ocorrendo desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. O gênero *Eugenia* é muito utilizado na medicina popular e diversas propriedades terapêuticas tem sido descrita na literatura para extratos e óleos essenciais, como atividade antirreumática, atividade antidiabética, anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana. A avaliação do óleo volátil das folhas de *E. involucrata* revelou a presença de 92% de sesquiterpenos, uma classe de moléculas cada vez mais estudada no controle da progressão tumoral. Com isso objetivo deste trabalho foi de avaliar os efeitos citotóxicos *in vitro* do óleo essencial de *Eugenia involucrata,* em linhagens celulares de fibroblasto murino (McCoy), melanoma murino (B16F10) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). O óleo apresentou citotoxidade para linhagens tumorais estudas, com IC50 de 24,06 µg/mL para a linhagem MCF-7 e índice de seletividade de 4,82 dessa linhagem em relação à linhagem não tumoral, o que torna interessante o prosseguimento dos experimentos com essas células. Além disso, o óleo induziu alterações morfológicas compatíveis com um processo de morte celular por apoptose.

Introdução

A cerejeira-do-mato, no popular da *Eugenia involucrata*, é nativa do Sul do Brasil, e ocorre desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (CAMLOFSKI, 2008). Na medicina popular, as folhas são empregadas na forma de chás, com ação antidiarréica e digestiva. A avaliação da composição química do óleo volátil revelou a presença de 11 substâncias principais, todas sesquiterpenos, representando aproximadamente 92% do conteúdo total de óleos voláteis (DEGENHARD ET AL, 2007). Os sesquiterpetos são uma classe de moléculas cada vez mais estudados na redução da progressão de tumores, encorajando estudos como potenciais drogas anticâncer (MODZELEWSKA ET AL, 2005). Assim, óleo essencial das folhas de *E. Involucrata* pode apresentar um grande potencial na atividade antitumoral (DE QUEIROZ, 2007). Como há poucos estudos relacionado a espécie *Eugenia Involucrata* e a sua atividade antitumoral, este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos citotóxicos *in vitro* do óleo essencial de *Eugenia involucrata,* em linhagens celulares de fibroblasto murino (McCoy), melanoma murino (B16F10) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).

Materiais e Métodos

Cultivo celular: Os ensaios foram realizados em células de fibroblastos normais (McCoy, ATCC® CRL-1696™), melanoma murino (B16 F10, 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), estreptamicina (100 mg/L) e penicilina (100 UI/L) mantidas a 37ºC, sob atmosfera de 5% de CO_2.

Ensaio de Citotoxicidade através da metabolização do reagente MTT: As células ($15x10^3$) foram adicionadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI completo (com soro fetal bovino e antibióticos). Após 24 h as células foram tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial. Após 72 h as células foram lavadas e incubadas com uma solução de MTT a 5 μm/ml. Depois de 2 h o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em álcool isopropílico ácido. A leitura da absorbância foi feita em 550 nm em leitor de microplacas.

Análise morfológica: Para ensaio de morfologia celular, as células foram adicionadas em placas de 24 poços contendo uma lamínula de vidro redonda. Após 24 h as células foram tratadas com a concentração de 84 µg/mL do óleo de *E. Involucrata.* Depois de 24 h de tratamento, as células foram coradas, montadas sobre lâmina, seladas com esmalte e posteriormente analisadas em microscópio óptico Olympus EX-41.

Cálculo da Concentração inibitória mínima IC50: A concentração que inibe em 50% a viabilidade das células em cultura (IC50) foi calculada usando programa GraphPad Prisma, versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) seguindo tutorial fornecido pela GraphPad Software, Inc, acessado em 19 de maio de 2018. (https://www.graphpad.com/support/faq/how-to-determine-an-icsub50sub/).

Cálculo do índice de seletividade: O índice de seletividade (IS) do óleo essencial foi definido pela razão da IC50 do composto entre as linhagens não-tumoral (McCoy) e as tumorais (MCF-7 e B16F10) conforme fórmula a seguir:

$$IS = \text{(IC50 célula não tumoral)/(IC50 célula tumoral)}$$

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 ensaio de citotoxidade mostrou uma diminuição estatisticamente significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 0,84 µg/mL de óleo essencial *E. Involucrata* nas linhagens de fibroblasto (McCoy), melanoma B16F10 murinos e

adenocarcinoma de mama humano (MCF- 7). Mesmo que a citotoxicidade do óleo essencial de folhas da espécie *E. Involucrata* seja pouco estudada, já se sabe que sua composição química é constituída por sesquiterpertenos, como componentes majoritários. Os sesquiterpenos, assim como outras classes de terpenos são moléculas cada vez mais estudadas na redução da progressão de tumores (RAMOS ET AL, 2006; MODZELEWSKA ET AL, 2005).

A partir dos resultados de citotoxicidade, foram obtidos os dados de IC50. O IC50 é a concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular. O resultado foram: McCoy 116,07 µg/mL, B16F10 156,6 µg/mL, MCF-7 24,06 µg/mL. Esses valores expressam que o óleo acaba tendo maior atividade citotóxica nas linhagens MCF-7 e McCoy que para as células B16F10. A partir da razão entre o IC50 da linhagem não tumoral (McCoy) e as tumorais (MCF-7 e B16F10) foi obtido o valor de IS (índice de seletividade). Os resultados foram: para B16F10, 0,74 e para MCF-7, 4,82. O valor de IS obtido para a linhagem MCF7 foi maior do que 2, demonstrando que o óleo pode ter ação mais específica para as células neoplásicas em relação a não neoplásica (McCoy). 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.

Já nos ensaios morfológicos foi possível verificar que o óleo de *E. involucrata*, na concentração de 84 µg/mL foi capaz de induzir alterações morfológicas importantes nas linhagens tumorais testadas, como arredondamento celular, perda de adesão ao substrato, formação de *blebs e* condensação de cromatina. Muitas dessas alterações são compatíveis com processo de morte celular por apoptose, mas isso ainda precisa ser confirmado com a utilização de técnicas mais específicas para esse fim (MEER ET AL, 2010).

Conclusões

O óleo essencial de *E. involucrata* apresentou citotoxidade para as linhagens tumorais de melanoma murino (B16F10), fibroblasto murino (McCoy) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). O óleo foi capaz de induzir alterações morfológicas compatíveis com um processo de morte celular por apoptose e o valor de IS para a linhagem MCF-7, em relação a linhagem não tumoral, encoraja o prosseguimento dos estudos.

Agradecimentos

Á professora Katia Paludo pela orientação cuidadosa do trabalho e pelo conhecimento transmitindo durante o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço também ao CNPQ pela oportunidade de realizar este trabalho com auxílio financeiro na forma de bolsa de iniciação científica. E aos meus colegas do laboratório 55, por todo conhecimento transmitido.

Referências

AYESH, B.M.; ABEB, 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.

CAMLOFSKI, A. M. O. Caracterização do fruto de Cerejeira Eugenia involucrata DC visando seu aproveitamento tecnológico [dissertação]. **Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa**, 2008.

DE QUEIROZ, JULIA MAIA GALVÃO ET AL. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de Eugenia como fitoterápico. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 9, n. 2, p. 87-100, 2015.

DEGENHARDT, JULIANA; FRANZON, RODRIGO CEZAR; DA COSTA, RAQUEL ROSA. **Cerejeira-do-mato (Eugenia involucrata)**. Embrapa Clima Temperado, 2007.

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.

MODZELEWSKA, A.; SUR, S.; KUMAR, S. K.; KHAN, S. R. Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. Currente Medicinal Chemistry: Anti Cancer Drugs. 5:477-499, 2005.

RAMOS, M. F. S.; SIANI, A. C.; SOUZA, M. C.; ROSAS, E. C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais de cinco espécies de Myrtaceae.. **Revista Fitos**. 2:58-66, 2006.