

## **AÇÃO CITOTÓXICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CAPIM-LIMÃO E DE CITRONELA PERANTE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA**

STONE, Simone Cardozo<sup>1</sup>; VASCONCELLOS, Flávia Aleixo<sup>2</sup>

LEITE, Fábio Pereira Leivas<sup>2</sup>

1 – Instituto de Biologia – UFPel; 2 – Biotecnologia/CDTec – UFPel;  
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.  
simonecstone@gmail.com

### **1 INTRODUÇÃO**

O câncer é uma doença de origem genética, causada por alterações estruturais e/ou funcionais de genes responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação celular. Essas alterações podem ser herdadas ou surgir como consequência da exposição a fatores de risco, como carcinógenos e agentes infecciosos (ROCHA; FERREIRA, 2004). O câncer de mama constitui atualmente o tipo de câncer mais comum entre as mulheres e o segundo com maior frequência no mundo. Cerca de 20% dos novos casos de câncer em mulheres ao ano, são de câncer de mama. Estima-se, para o ano de 2010 cerca de 49.240 novos casos para o país (Instituto Nacional de Câncer, 2009).

A maioria dos sistemas de quimioterapia faz uso de drogas citotóxicas de natureza não discriminatória, o que causa danos colaterais às células normais. Sendo assim, pesquisadores têm estudado o uso de derivados de plantas no tratamento do câncer, buscando efeitos terapêuticos e maior especificidade (EDRIS, 2007). Diversos extratos de plantas já são empregados com sucesso no tratamento do câncer, inclusive no de mama (DA ROCHA et al., 2001). O óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), e o composto citral, seu principal constituinte, tem demonstrado importantes características antitumorais, já o emprego do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) ainda não possui atividade amplamente conhecida (DUDAI et al., 2005; NEGRELLE; GOMES, 2007; RABBANI; DEVI; SHIVANANDA, 2004).

Neste trabalho avaliamos o efeito citotóxico dos óleos essenciais de capim-limão e de citronela, perante a linhagem celular de câncer de mama MCF-7.

### **2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)**

#### **Óleos essenciais**

Os óleos essenciais de capim-limão (*C. citratus*) e de citronela (*C. nardus*) (Pólo Oleoquímico de Três Passos, RS) foram diluídos em etanol absoluto (Merck). Diluições, de logaritmo base dois, foram feitas a partir do óleo puro e expressos em valores de porcentagem total de óleo.

#### **Cultivo celular**

A linhagem celular de câncer de mama humano, MCF-7 (ATCC HTB-22), foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

As células foram mantidas em meio de cultivo celular *Minimum Essential Medium* (MEM) (Gibco, Invitrogen), contendo 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma), acrescido de 10% de soro bovino fetal (SFB) (Cultilab). Sendo mantidas em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após atingirem subconfluência, ou seja, ocuparem cerca de 80% do frasco de cultivo, as células foram subcultivadas com auxílio da enzima tripsina.

### **Ensaio de citotoxicidade**

As células foram subcultivadas em microplacas de cultivo de 96 cavidades (TPP) à densidade de  $1,5 \cdot 10^4$  células/0,1mL/cavidade. Após incubação por 24h, em estufa de cultivo celular, o meio foi removido e adicionado meio com 1,5% SFB contendo diluições dos compostos em etanol. O efeito citotóxico foi avaliado por incubação de 24h.

Cavidades da mesma placa foram destinadas a controles, onde as células eram expostas a condições normais e ao excipiente do produto (etanol). Para evitar interferências causadas pela volatilidade dos produtos, as cavidades das placas foram cobertas com papel-filme.

### **Coloração por Cristal Violeta**

Baseado no protocolo de Sanford et al. (1951), as cavidades foram lavadas com *phosphate buffered saline* (PBS) e a placa incubada por 10min em temperatura ambiente com PBS a 5% de formaldeído, para a fixação das células. Após nova lavagem com PBS, acrescentou-se a solução de cristal violeta 0,05%. Passado o período de 10min de incubação, a solução foi removida e adicionada a solução de 1% de SDS para solubilizar o corante. A placa foi mantida em agitação até a obtenção de uma coloração uniforme, e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (TERMOPLATE-TPreader) a 570 nm.

### **Análise Estatística**

Foram realizados quatro ensaios independentes, sendo cada um em triplicata. Valores de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória 50%) foram calculados pela função logística paramétrica. A análise estatística dos resultados foi feita por análise de variância (ANOVA) e Teste-T. O  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A faixa de densidade celular de  $1-2 \cdot 10^4$  células/0,1mL/cavidade demonstrou crescimento celular adequado, não havendo crescimento excessivo nas cavidades da microplaca, o que proporcionou avaliação das diferentes absorbâncias obtidas no teste.

A viabilidade celular da célula MCF-7 quando em contato por 24h com os óleos de capim-limão e de citronela está demonstrada na Fig. 1. O excipiente do produto não apresentou alterações significativas.

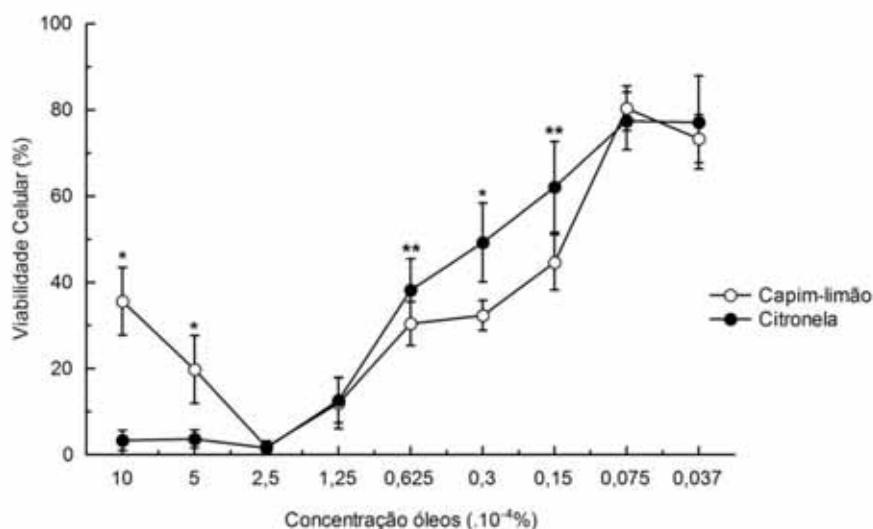


Figura 1 – Viabilidade celular da célula MCF-7 aos óleos essenciais de capim-limão e de citronela. Valores constituídos das médias de 4 experimentos independentes (+/- E.P.M). O teste estatístico ANOVA demonstrou que os gráficos são significativos ( $P < 0,0001$ ). \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P$  não significativo (Teste-T).

O óleo de capim-limão mostrou-se mais tóxico às células que o de citronela, uma vez que apresentou  $IC_{50}$  de  $0,15 \cdot 10^{-4}\%$  enquanto o outro, apresentou  $IC_{50}$   $0,46 \cdot 10^{-4}\%$ . Sendo assim, o óleo de citronela necessita de uma quantidade três vezes maior que o de capim-limão para promover a inibição de metade da população celular. A inibição de 100% da população celular ocorre na mesma concentração para os dois óleos ( $2,5 \cdot 10^{-4}\%$ ), como visualizado na Fig. 1.

Surpreendentemente, quando as células entraram em contato com o óleo de capim-limão mais concentrado, seu efeito citotóxico foi reduzido. Este fato ainda requer estudos mais detalhados, com utilização de outras técnicas e linhagens celulares. A princípio acredita-se que o óleo apresenta melhor efeito citotóxico na concentração de  $0,625 \cdot 10^{-4}$  a  $5 \cdot 10^{-4}\%$ . Em maiores concentrações talvez ocorra acúmulo das moléculas de óleo, inviabilizando a penetração nas células.

Segundo Chaouki et al. (2009), o principal componente do óleo essencial de capim-limão, citral, causou inibição do crescimento celular das células MCF-7 com apoptose e parada do ciclo celular, o que colabora com os resultados obtidos no presente trabalho. No estudo de Koba et al. (2009), a citotoxicidade dos óleos essenciais de capim-limão e de citronela foi avaliada na linhagem não tumoral de queratinócito humano, HaCat, e concluiu-se que ambos os óleos em concentrações inferiores a 2,5% não induziram nenhuma alteração nessas células, levando a crer que a linhagem MCF-7 é bem mais suscetível a ação dos mesmos.

#### 4 CONCLUSÕES

Tanto o óleo essencial de capim-limão quanto o de citronela apresentaram efeito citotóxico na célula de câncer de mama, MCF-7. Estudos mais aprofundados serão realizados a fim de entender o mecanismo de ação desses óleos e ainda, demonstrar a citotoxicidade em outras células tumorais e não tumorais.

## 5 REFERÊNCIAS

CHAOUKI, W.; LEGER, D. Y.; LIAGRE, B.; BENEYTOUT, J.; HMAMOUCHE, M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 5, p. 549–556, 2009.

DA ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural Products in Anticancer Therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p.364–369, 2001.

DUDAI, N.; WEINSTEIN, Y.; KRUP, M.; RABINSKI, T.; OFIR, R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Plant Med**, New York, v. 71, p. 484-488, 2005.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v.21, n. 4, p.308-323, 2007.

Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/> Acessado em: 08/01/2010.

KOBA, K.; SANDA, K.; GUYON, C.; RAYNAUD, C.; CHAUMONT, J.; NICOD, L. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 29-34, 2009.

NEGRELLE, R.R.B.; GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.1, p.80-92, 2007.

RABBANI, S. I.; DEVI, K.; SHIVANANDA, T. N. Studies on antimutagenic effects of citral in mice. **Food, Agriculture & Environment**, v. 2, n. 2, p. 62-64, 2004.

ROCHA, J. C. C.; FERREIRA, C. G. **Oncologia Molecular**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 470p.

SANFORD, K.K.; EARLE, W.R.; EVANS, V.J.; WALTZ, H.K.; SHANNON, J.E. The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 11, n. 4, p.773-95, 1951.