

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Ação citotóxica dos óleos de capim-limão e de citronela,
e do composto citronelal original e modificado,
em células tumorais e não tumorais**

Simone Cardozo Stone

Pelotas, 2010

SIMONE CARDOZO STONE

**AÇÃO CITOTÓXICA DOS ÓLEOS DE CAPIM-LIMÃO E DE CITRONELA, E DO
COMPOSTO CITRONELAL ORIGINAL E MODIFICADO, EM CÉLULAS
TUMORAIS E NÃO TUMORAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas,
Instituto de Biologia, Universidade Federal de
Pelotas.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
Co-Orientador: MSc. Flávia Aleixo Vasconcellos

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S877a Stone, Simone Cardozo
Ação citotóxica dos óleos de capim-limão e de citronela, e do composto citronelal original e modificado, em células tumorais e não tumorais / Simone Cardozo Stone. – 47f. – Monografia (Conclusão de curso). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2010. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite; co-orientador Flávia Aleixo Vasconcellos.

1.Biologia. 2.Citotoxicidade. 3.Plantas medicinais.
4.Câncer de mama. 5.IC50. 6.Seletividade. 7. Cymbopogon citratus. 8.Cymbopogon nardus. 9. Vero. 10. MCF-7. 11. Modificação química. I.Leite, Fábio Pereira Leivas. II.Vasconcellos, Flávia Aleixo. III. Título

CDD: 633.88

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (orientador)

Prof. Dr. Geferson Fischer

Msc. Luana Alves Dummer

Dra. Talita Bandeira Roos

À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, exemplo de dedicação e batalha. Ensinou-me a não desistir de buscar o que quero, mesmo quando essa tarefa não é nada fácil. Agradeço pelo seu grande apoio, amor, confiança e dedicação. Um obrigado nunca será suficiente!

Ao meu pai, pelo amor e carinho, que apesar da diminuída convivência, sempre esteve ao meu lado, desejando o meu melhor.

Ao meu padrasto, Marco, pela dedicação, por sempre estar disposto a me ajudar seja o que for, desde capturar insetos nas praças até me levar para procurar as plantas que faltavam no herbário.

Ao meu irmão, Bruno, pelas conversas e distrações, pelo seu carinho e amizade.

Ao meu namorado, César, pelo amor, compreensão, auxílio e apoio, e por acreditar que eu conseguiria superar as dificuldades encontradas ao longo do trabalho.

Aos meus melhores amigos, Jaque e Léo, que tornaram mais felizes os longos anos que conto com suas amizades. Por, não importando a distância, estarem sempre ao meu lado, me apoiando e me alegrando.

A Juliana, colega de curso e grande amiga, sempre disposta a me escutar e ajudar. E juntamente com as outras grandes amigas, Neida e Cristiele, agradeço pelas conversas, estudos, jantas, fofocas (risos) e desabafos. Sem vocês a faculdade teria sido muito sem graça!

Ao professor Fábio Leivas Leite, que aceitou de bom grado ser meu orientador nesse trabalho. Pela confiança, incentivo e disponibilidade de me auxiliar, sempre que preciso e por compartilhar seu conhecimento.

A minha co-orientadora e amiga, Flávia, pelo auxílio, trocas de idéia, apoio e por acreditar no meu potencial. Agradeço também pela oportunidade de poder acompanhar seu trabalho de doutorado, despertando em mim, ainda mais, o gosto pela ciência.

A todas as pessoas que, apesar de não mencionadas, fazem parte da minha vida e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e de minha formação.

RESUMO

STONE, Simone Cardozo. **Ação citotóxica dos óleos de capim-limão e de citronela, e do composto citronelal original e modificado, perante células tumorais e não tumorais.** 2010. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O câncer constitui-se em uma das principais causas de óbito no mundo. Nas mulheres o mais prevalente é o câncer de mama, que quando diagnosticado tardiamente tem alto risco de mortalidade. A busca de medicamentos oriundos de fontes naturais está em constante crescimento e diversos componentes de plantas já são empregados com sucesso no tratamento do câncer, inclusive no de mama. O óleo essencial de capim-limão tem demonstrado importantes características antitumorais, já o emprego do óleo essencial de citronela e do composto citronelal, original e modificado quimicamente, ainda não possuem suas atividades totalmente conhecidas. Há escassez de estudos desses óleos e composto no combate ao câncer de mama, ainda mais sobre o uso do citronelal modificado quimicamente, objetivando elevar sua capacidade farmacológica. Este trabalho visa analisar a citotoxicidade, através de ensaio de coloração por cristal violeta, dos óleos essenciais de capim-limão e de citronela, bem como do composto citronelal original e modificado quimicamente, em células da linhagem de carcinoma mamário (MCF-7) e da linhagem não tumoral (Vero). A análise dos produtos revelou efeito citotóxico, em diferentes intensidades, para ambas as linhagens celulares, sendo o composto citronelal o mais seletivo por apresentar maior citotoxicidade para MCF-7 do que para Vero. A modificação química do composto citronelal acarretou em maior efeito citotóxico, porém menor seletividade.

Palavras-chave: Poaceae. *Cymbopogon citratus*. *Cymbopogon nardus*. Plantas Medicinais. IC₅₀.

ABSTRACT

STONE, Simone Cardozo. **Cytotoxic activity of essential oils from lemongrass and citronella, and the citronellal compound original and modified, against tumor and not tumor cells.** 2010. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Cancer is a major health problem worldwide, being one of the leading causes of deaths. Breast cancer is the most common cancer in women and the late diagnostic have high death risk. The search for medicines from plants is increasing. Diverse plants components have been used for the treatment of various kinds of cancer, breast cancer included. The essential oil of lemon grass have been showing antitumor propriety, however the citronella essential oil and the citronellal compost, original and modified, does not have any activity known. There is a lack of studies from the anti breast cancer activity of this oils and composts, especially when the citronellal compost is chemically modified for increase it pharmacological potential. The aim of this study is evaluate the effect of the essential oil of lemon grass and citronella, and the citronellal compost, original and modified, on cultivate breast cancer cells (MCF-7) and normal cells (Vero), using the crystal violet assay for cell viability. The products demonstrated cytotoxicity for both cell lines, however with different intensities. The citronellal oil was the most selective compost being more toxic for MCF-7 than Vero cell line. The chemical modification of the citronellal compound resulted in higher cytotoxic effect, but less selectivity.

Keywords: Poaceae. *Cymbopogon citratus*. *Cymbopogon nardus*. Medicinal plants. IC₅₀.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência de câncer para ambos os sexos e todas as idades	18
Figura 2	Mortalidade do câncer para ambos os sexos e todas as idades.....	18
Figura 3	Drogas anticancerígenas disponíveis no período de 1940 a 06/2006.....	21
Figura 4	Espécime de <i>Cymbopogon citratus</i>	23
Figura 5	Espécime de <i>Cymbopogon nardus</i>	24
Figura 6	R-Citronelal.....	28
Figura 7	C37A.....	28
Figura 8	Viabilidade celular das células MCF-7 e Vero aos óleos essenciais de capim-limão e de citronela.....	33
Figura 9	Viabilidade celular das células MCF-7 e Vero aos compostos citronelal original e modificado	35
Figura 10	Concentração inibitória de 50% da população celular pelos óleos essenciais.....	36
Figura 11	Concentração inibitória de 50% da população celular pelos compostos químicos.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Índice de seletividade (IS) dos produtos entre a linhagem de câncer de mama, MCF-7, e a linhagem não tumoral, Vero.....	37
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BRCA	<i>Breast Cancer</i> (câncer de mama)
°C	Grau Celsius
CO ₂	Gás carbônico
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% da população celular
IS	Índice de seletividade
m	Metro
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> (Meio Mínimo Essencial)
mL	Mililitro
mM	Milimolar
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SFB	Soro Fetal Bovino
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Câncer	17
2.2 Câncer de mama	19
2.3 As plantas e o câncer	21
2.4 Óleos essenciais.....	22
2.5 <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão)	23
2.6 <i>Cymbopogon nardus</i> (citronela).....	24
2.7 Citronelal.....	25
2.8 Fármacos semi-sintéticos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Óleos essenciais e compostos químicos	27
3.2 Cultivo celular.....	28
3.3 Ensaio de citotoxicidade	28
3.3.1 Coloração por Cristal Violeta.....	29
3.4 Cálculo dos parâmetros de citotoxicidade.....	30
3.5 Índice de seletividade (IS).....	30
3.6 Análise Estatística.....	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Preparo dos óleos e compostos.....	31
4.2 Viabilidade celular.....	31
4.3 Citotoxicidade dos óleos essenciais às células MCF-7 e Vero	31

4.4 Citotoxicidade dos compostos químicos às células MCF-7 e Vero	33
4.5 Concentração inibitória 50%.....	36
4.6 Índice de seletividade.....	37
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÕES	41
7 REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das enfermidades que mais acomete a população mundial, sendo considerada a segunda causa de morte de natureza conhecida no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009) e responsável por 12% do total anual de óbitos no mundo (WHO, 2008). A doença tem origem genética, uma vez que falhas nos genes responsáveis pela regulação do crescimento e/ou diferenciação celular culminam na proliferação celular sem limite que acaba por atingir tecidos adjacentes e outros órgãos que não o afetado (ROCHA; FERREIRA, 2004).

O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres e o segundo com maior frequência no mundo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009). Sua alta frequência deve-se tanto a fatores intrínsecos, como exposição a hormônios e herança genética, e também a fatores extrínsecos como o estilo de vida (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

Os quimioterápicos sintéticos utilizados no tratamento do câncer, em geral não possuem natureza discriminatória, o que acarreta danos às células normais de alta proliferação. Para reverter este quadro, pesquisadores cada vez mais investem em estudos de drogas alternativas originárias de fontes naturais (EDRIS, 2007). Devido a sua enorme variabilidade química oriunda da grande diversidade de organismos, a natureza é uma importante fonte de possíveis compostos terapêuticos, e dentre esses organismos, as plantas são consideradas fonte dos fármacos mais eficazes e promissores (SAKLANI; KUTTY, 2007). Apesar de apenas uma pequena parcela da riqueza natural já ter sido explorada, os fármacos disponíveis originários ou derivados de fonte natural, utilizados na terapia anticancerígena já correspondem a mais da metade do total (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, conhecida por capim-limão, é uma erva nativa do sudoeste do continente asiático (CASTRO; RAMOS, 2002), utilizada para diversos fins que vão desde a medicina alternativa até a utilização em perfumaria (NEGRELLE; GOMES, 2007). Diversas pesquisas já exaltaram seu importante papel anticancerígeno (MANOSROI; DHUMTANOM; MANOSROI, 2006; PUATANACHOKCHAI et al., 2002; SUAHEYUN et al., 1997). Já *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, planta próxima da anterior, conhecida por citronela (CASTRO; RAMOS, 2002), não foi tão amplamente pesquisada como possível anticancerígena, tendo sua utilização reservada principalmente ao uso em repelente contra insetos (AKHILA, 2010; CASTRO et al., 2010). O composto citronelal, extraído, dentre outras, da planta citronela (NHU-TRANG et al, 2006) e utilizado na fabricação de produtos industriais (LENARDÃO et al., 2007), também não obteve estudos mais amplos de seu possível potencial no tratamento anticancerígeno. Tampouco seu análogo semi-sintético, C37A, derivado de sua modificação estrutural pela introdução do grupo químico amina.

O emprego de drogas semi-sintéticas possibilita contornar os fatores que limitam o bom funcionamento do princípio ativo, tornando-o mais seletivo, ativo e por conseqüência aumentando seu poder farmacológico (CECHINEL FILHO; ROSENDO, 1998). Conseqüentemente, diversos fármacos semi-sintéticos já são utilizados na quimioterapia antitumoral (NEWMAN; CRAGG, 2007).

A bibliografia referente à utilização dos óleos essenciais de capim-limão e de citronela no combate ao câncer de mama encontra-se escassa, bem como o potencial uso do composto citronelal no tratamento desse câncer, tampouco quando modificado quimicamente. Por esse motivo, propomos o estudo da citotoxicidade desses óleos e compostos, a fim de verificar o seu potencial de seletividade em células de tumor de mama, MCF7 e células não tumorais, Vero.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Avaliar o efeito citotóxico dos óleos essenciais de capim-limão e de citronela, bem como do composto citronelal original e modificado quimicamente, perante a linhagem de tumor de mama MCF-7 e a linhagem não tumoral Vero.

1.1.2 Específicos

- Determinar o efeito citotóxico dos óleos essenciais e dos compostos sobre as duas linhagens celulares;
- Determinar as concentrações dos óleos e compostos que causam inibição de 50% da população celular (IC_{50}) de MCF-7 e Vero;
- Estabelecer o índice de seletividade (IS) de cada óleo e composto para determinar se houve maior efeito na célula tumoral do que na célula não tumoral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer

Câncer é a denominação dada a um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pela proliferação celular sem limite. As células cancerígenas acumulam alterações estruturais e/ou funcionais nos genes responsáveis pela regulação do crescimento e diferenciação celular, o que ocasiona falhas no mecanismo de controle de crescimento (ALBERTS et al., 2002; ROCHA; FERREIRA, 2004). Essas alterações são causadas tanto por fatores externos (como tabaco, exposição solar, organismos infecciosos, radiação e produtos químicos) como internos (mutações hereditárias e decorrentes do metabolismo, hormônios e condições imunes) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

O crescimento celular exacerbado forma massas teciduais, conhecidas como tumor, ou neoplasia, o qual pode ser classificado em benigno e maligno. O tumor benigno acarreta menor risco ao paciente por apresentar crescimento lento e formar massas localizadas, sem invasão de outros tecidos. Já o tumor maligno, contém células de rápido crescimento que podem colonizar tecidos adjacentes e se espalhar, metastizar, através do organismo (SPENCER, 2007).

Anualmente, cerca de 12 milhões de novos casos são diagnosticados no mundo, sendo mais de sete milhões fatais, o que torna o câncer responsável por 12% do total anual de óbitos (GLOBOCAN, 2008; WHO, 2008). Estima-se que esse número irá aumentar com o passar dos anos, duplicando até o ano de 2030. Mais da metade dos casos diagnosticados ocorrem em países desenvolvidos, onde é considerada a segunda principal causa de óbito, enquanto em países em desenvolvimento ocupa o quinto lugar, sendo o motivo de uma em cada dez mortes.

No entanto, esse valor tende a aumentar nesses países, devido às melhorias das condições de vida e aumento da expectativa de vida (WHO, 2008). Os mais prevalentes, independente de sexo, são câncer de pulmão, estômago, mama, próstata e cólon, sendo o primeiro responsável pela maior taxa de mortalidade (Fig. 1 e 2) (GLOBOCAN, 2008).

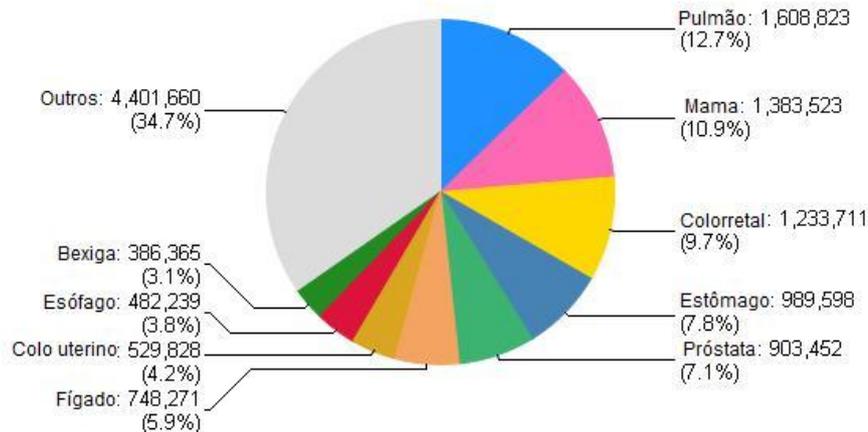


Figura 1 – Incidência mundial de câncer para ambos os sexos e todas as idades (n= 12667,47). Modificado de GLOBOCAN 2008 (IARC).

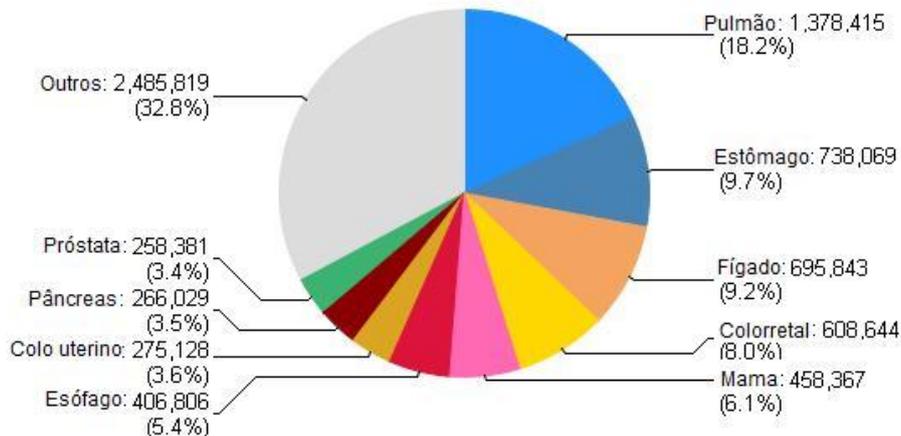


Figura 2 – Mortalidade mundial do câncer para ambos os sexos e todas as idades (n= 7571,501). Modificado de GLOBOCAN 2008 (IARC).

Quanto mais cedo diagnosticado, melhor o prognóstico do câncer, uma vez que, a chance de sobrevivência é maior e as opções de tratamento variadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010). No entanto, a maioria dos casos no Brasil é diagnosticada tardiamente, contribuindo para as elevadas taxas de mortalidade causada pela doença (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009).

As opções de tratamento variam conforme o estágio e as características biológicas do tumor, bem como a idade do paciente e os riscos associados ao tipo de tratamento escolhido. As opções incluem cirurgia, terapia hormonal, quimioterapia, radioterapia e terapia biológica (uso de anticorpos monoclonais humanizados) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010).

No Brasil, considerado a segunda causa de morte de natureza conhecida, estima-se para os anos de 2010 e de 2011 cerca de 489.270 casos novos de câncer no país, sendo distribuídos em 236.240 casos para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. A distribuição desses casos ocorre de forma heterogênea, sendo as regiões mais acometidas a Sul e a Sudeste, enquanto as regiões Norte e Nordeste as menos acometidas, restando às taxas intermediárias para a região Centro-oeste (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009).

2.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama constitui atualmente o tipo 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 mama. Estima-se, para o ano de 2010 cerca de 49.240 novos casos para o Brasil (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2009). Apesar de sua elevada ocorrência, a taxa de sobrevivência dos pacientes é alta nos países desenvolvidos, chegando a 85%, por outro lado nos países em desenvolvimento, atinge apenas cerca de 50-60%. Devido a essa alta taxa de sobrevivência, o câncer de mama é o mais predominante na população mundial (WHO, 2008).

Os tumores de mama, em sua maioria, são originários do epitélio ductal (cerca de 80%), enquanto uma minoria tem origem no epitélio lobular. Os carcinomas ductais são também considerados precursores do câncer de mama invasivo, correspondendo a aproximadamente 70% dos casos (LI, 2009).

As causas mais propícias ao câncer de mama são o sexo feminino (há ocorrência da doença em homens também, sendo a frequência menor que 1% (WHO, 2008)) e a idade, uma vez que a possibilidade de desenvolver a doença aumenta com o passar dos anos. Fatores diretamente correlacionados com a doença incluem tempo de exposição a hormônios, fatores hereditários e estilo de vida (SAUTER; DALY, 2010). A exposição prolongada a hormônios, principalmente

estrogênio e androgênio, acarreta em risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). Por esse motivo a nuliparidade ou gravidez tardia, a menarca precoce, a menopausa tardia e o uso de hormônios (recente uso de contraceptivos ou reposição hormonal prolongada) aumentam a ocorrência da doença. O risco também é aumentado pelo histórico de câncer de mama na família, principalmente em parentes de primeiro-grau, sendo que quanto maior o número de casos, maior a probabilidade (SAUTER; DALY, 2010). A herança genética da mutação nos genes BRCA1 e BRCA2, associados à suscetibilidade a doença, é responsável pela ocorrência de cerca de 50% dos casos de tumor mamário em mulheres com presença dessa mutação (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009). Esses genes estão envolvidos em diferentes funções celulares, atuando, por exemplo, no controle do ciclo celular (GIORDANO, NORMANNO, 2009).

Apesar da maioria dos fatores mencionados não serem passíveis de modificações, os causados pelo estilo de vida, na maior parte dos casos, podem ser controlados a fim de prevenir o aparecimento da enfermidade. Entre esses fatores estão consumo de álcool, obesidade e sedentarismo (ROSES, 2005).

Nas fases iniciais não há sintomas típicos da enfermidade, no entanto quando o tumor atinge dimensões maiores podem ocorrer dores, inchaço e alteração da pele que recobre a mama (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2010). Por não ser possível um diagnóstico adequado com base em sintomas, as mulheres devem consultar com freqüência médicos ginecologistas, para monitoramento de possíveis alterações neoplásicas. Para tanto, tipicamente realiza-se exame clínico das mamas e mamografia, onde é possível o diagnóstico precoce de tumores mamários (SAUTER; DALY, 2010).

Quando a neoplasia é verificada, o tratamento mais adequado é prescrito, de acordo com o tamanho, histologia, perfil molecular e estágio do tumor, avaliando-se o risco inerente aos procedimentos (LI, 2009). Geralmente as pacientes são submetidas a algum tipo de cirurgia, a qual pode ser aliada a outros tratamentos tais como radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e/ou terapia biológica (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

2.2 As plantas e o câncer

Desde a antiguidade, os produtos naturais, em especial as plantas, servem de fonte indispensável para o tratamento de enfermidades. Povos ancestrais, como os egípcios, chineses, indianos, gregos e romanos, desenvolveram diversos medicamentos derivados de plantas, os quais muitos são ainda utilizados na medicina moderna (BUSS; BUTLER, 2010).

Em estudo realizado por Newman e Cragg (2007), observou-se que de todas as drogas anticancerígenas disponíveis no período de 1940 a 2006, mais da metade são de origem natural ou derivadas/modificadas da mesma (Fig. 3).

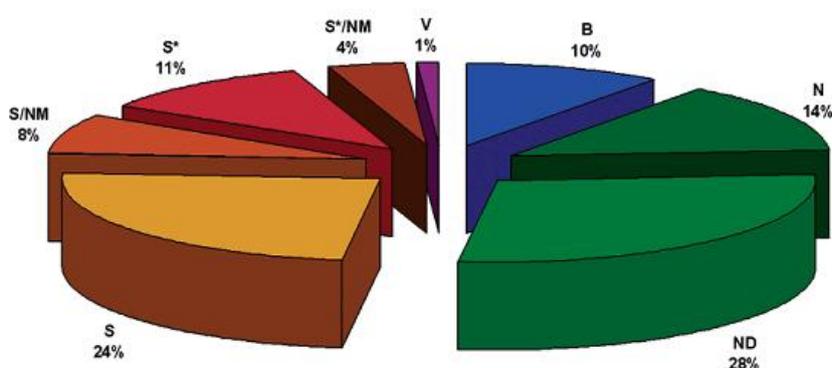


Figura 3 – Drogas anticancerígenas disponíveis no período de 1940 - 06/2006 (n= 175). N: produto natural; ND: produto natural derivado; S: sintético; S*: sintético com farmacóforo natural; NM: produto natural mimetizado; B: produto biológico; V: vacina (NEWMAN; CRAGG, 2007).

As drogas sintéticas utilizadas na terapia contra o câncer, muitas vezes apresentam efeito inespecífico, devido a sua alta citotoxicidade, acarretando danos colaterais às células normais de rápida proliferação. Sendo assim, a procura por drogas alternativas levou pesquisadores a buscar cada vez mais agentes naturais, uma vez que estes poderiam apresentar efeito terapêutico com baixa citotoxicidade (EDRIS, 2007; REDDY; ODHAVA; BHOOLAB, 2003).

Muitos compostos oriundos de plantas são empregados com sucesso na terapia do câncer, e alguns dos fármacos mais promissores e eficazes originam-se dessa fonte (SAKLANI; KUTTY, 2008). O exemplo mais significativo foi a descoberta dos alcalóides vinblastine e vincristine, isolados a partir da planta vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), considerados os primeiros compostos derivados de plantas a serem introduzidos na terapia anticancerígena. Conjuntamente com outras drogas

quimioterápicas, esses alcalóides são utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer, tais como, leucemias, linfomas e câncer de mama e de pulmão (CRAGG, NEWMAN; 2005). Outros fármacos originários de plantas utilizados atualmente como quimioterápicos são o camptotecina (originário de *Camptotheca acuminata* Decne.), o combretastatina (de *Combretum caffrum* Kuntze) e o epipodofilotoxina (de *Podophyllum peltatum* L.), enquanto vários outros estão em diferentes estágios de testes clínicos (SAKLANI; KUTTY, 2008). No tratamento do câncer de mama, além dos alcalóides acima citados, são principalmente utilizados o composto Paclitaxel (nome comercial Taxol[®], originalmente obtido do súber de *Taxus brevifolia* Nutt.) e seu análogo semi-sintético, Docetaxel (CRAGG; NEWMAN, 2005; MA; WANG, 2009).

2.2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos voláteis, com forte odor, produtos naturais do metabolismo secundário de plantas aromáticas. São formados por misturas de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, sendo os mais abundantes constituídos por terpenos e terpenóides (BAKKALI et al., 2008).

Todos os órgãos das plantas aromáticas são capazes de produzir os óleos essenciais, os quais são armazenados em células secretoras e epidermais, canais, cavidades e tricomas (BAKKALI et al., 2008). Para serem extraídos, esses locais de armazenagem devem ser rompidos. A primeira técnica que possibilitou esse processo foi a destilação, por água ou vapor, sendo posteriormente desenvolvidos outros métodos, a fim de aumentar a grande demanda (RAHIMAN et al., 2008).

Na natureza conferem às plantas proteção contra micro-organismos, insetos e herbívoros, além de atrair polinizadores (BAKKALI et al., 2007). Também são úteis ao homem por apresentarem propriedades medicinais, antimicrobianas e repelentes e pelo emprego industrial, como aromatizante, flavorizante e conservante (RAHIMAN et al., 2008).

Devido ao grande número de constituintes presentes nos óleos essenciais, é provável que estes não possuam alvos celulares específicos. De fato, análises realizadas por microscopia eletrônica revelam que os mesmos alteram os diferentes compartimentos celulares, como a membrana plasmática, o citoplasma e o núcleo (BAKKALI et al., 2007). Os óleos essenciais e seus componentes apresentam característica hidrofóbica permitindo a sua interação com membranas celulares.

Sendo assim, possuem capacidade de penetrar na célula e interagir com componentes intracelulares ou, ainda, atuar no rompimento das membranas celulares. Isto ocasiona a perda da permeabilidade seletividade da célula, levando ao comprometimento de suas funções e, por fim, em eventual morte celular (CRISTANI et al., 2007).

As propriedades farmacêuticas das plantas aromáticas são em parte devidas aos seus óleos essenciais. Por esse motivo, esses compostos estão sendo pesquisados para a utilização na terapia do câncer, uma vez que estudos demonstram suas propriedades tanto na quimioterapia quanto na quimioprevenção (EDRIS, 2007).

2.2.1.1 *Cymbopogon citratus* (capim-limão)

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf (Fig. 4), conhecida popularmente por capim-limão, capim-cidreira e capim-cheiroso, é uma erva nativa do sudoeste do continente asiático, pertencente à família Poaceae. É uma planta perene, ereta, estolonífera e sua altura varia entre 0,60 m e 3 m. Suas folhas são estreitas e longas, aromáticas, glabras, membranáceas, com bordas cortantes e nervura paralelinérvea (CASTRO; RAMOS, 2002). Seu óleo essencial tem como principal constituinte o citral, composto formado pela mistura dos isômeros neral e geranial, que pode atingir até 90% da composição total do óleo (AKHILA, 2010).



Figura 4 – Espécimes de *Cymbopogon citratus*. Fonte: <http://gardeningwithwilson.com/2008/02/04/distinguishing-between-lemon-grass-citronella/>

O chá das folhas de *C. citratus* é amplamente utilizado na medicina popular devido as suas propriedades terapêuticas. Sua utilização compreende o tratamento de doenças gastrointestinais, uso como analgésico, antitérmico, antiinflamatório, antialérgico, entre outros. Além do uso terapêutico, a extração do óleo essencial do capim-limão é muito utilizada na indústria cosmética, alimentícia, farmacêutica e na perfumaria (NEGRELLE; GOMES, 2007).

Estudos revelam o potencial anticancerígeno de capim-limão tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro*. Suaeyun et al. (1997) demonstrou a capacidade do extrato etanólico de capim-limão na inibição de neoplasias coloretais em camundongos, enquanto Puatanachokchai et al. (2002) elucidou o efeito inibidor da fase precoce de hepatocarcinogênese em murinos. Quanto aos efeitos *in vitro*, o trabalho de Manosroi, Dhumtanom e Manosroi (2006) ilustrou o efeito antiproliferativo do óleo essencial nas linhagens celulares de carcinoma bucal (KB) e leucemia murina (P388).

2.2.1.2 *Cymbopogon nardus* (citronela)

Cymbopogon nardus (L.) Rendle (Fig. 5), conhecida popularmente por citronela, é uma planta herbácea, nativa da Índia e pertencente à família Poaceae. É perene, cespitosa, que atinge de 0,80 m a 1,20 m. Suas folhas são longas e estreitas, com margens ásperas, curvas e fortemente aromáticas (CASTRO; RAMOS, 2002). Os constituintes majoritários de seu óleo essencial são o citronelal e o geraniol, sendo o primeiro levemente mais abundante (AKHILA, 2010).



Figura 5 – Espécimes de *Cymbopogon nardus*. Fonte: <http://gardeningwithwilson.com/2008/02/04/distinguishing-between-lemon-grass-citronella/>

O chá de suas folhas é utilizado devido a propriedades calmantes, carminativas e digestivas (CASTRO et al., 2007; MAHALWAL; ALI, 2003). Enquanto seu óleo essencial é tradicionalmente utilizado como repelente contra insetos, além de também ser utilizado na indústria alimentícia como aromatizante e na fabricação de perfumes e cosméticos (AKHILA, 2010; CASTRO et al., 2010).

Estudos ilustram as propriedades antimicrobianas (OLIVEIRA et al., 2010), antifúngicas (BILLERBECK et al., 2001) e anticancerígenas (MANOSROI; DHUMTANOM; MANOSROI, 2006) de citronela, no entanto, há escassez de bibliografia com relação ao último efeito.

2.2.2 Citronelal

O composto citronelal é um aldeído monoterpeneo, constituinte majoritário dos óleos essenciais, entre outros, de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, *Cymbopogon winterianus* Jowitt e *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S.Johnson; é responsável pelo odor semelhante a limão presente nestes óleos (NHU-TRANG et al, 2006). Sua extração realiza-se tipicamente por destilação ou extração de solvente, onde é obtida uma mistura de seus enantiômeros S e R (LENARDÃO et al., 2007).

Considerado uma excelente fonte renovável e de baixo impacto ambiental, o citronelal é utilizado como material básico em numerosas sínteses orgânicas de compostos químicos (LENARDÃO et al., 2007). Além disso, é empregado na síntese de vitamina A, na fabricação de cosméticos e aromatização e ação desinfetante de produtos de limpeza (CASTRO et al., 2008; CASTRO et al., 2010).

De forma notável, Osato (1964), pioneiro no uso de citronelal como quimioterápico, reporta o tratamento de pacientes no Hospital Central da Prefeitura de Akita, Akita – Japão. Além de demonstrar que a administração de citronelal não provoca efeitos colaterais, Osato obteve êxito na cura de 12% dos pacientes, com diferentes carcinomas, tratados conjuntamente com citronelal e citral. Apesar dos efeitos demonstrados pelo pesquisador, estudos mais recentes são escassos.

2.2.3 Fármacos semi-sintéticos

As características estruturais únicas dos compostos naturais os consagram como ponto de partida para desenvolvimento de fármacos semi-sintéticos e sintéticos (BUTLER, 2005). Fato ilustrado pelo abundante uso de fármacos derivados de recursos naturais na terapia de diferentes enfermidades, dentre estas o câncer (como ilustrado na Fig. 3) (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Diversos fatores farmacológicos limitam o bom funcionamento dos produtos alvos, dentre eles, a absorção inadequada, biodisponibilidade incompleta, distribuição inespecífica e toxicidade. Assim, a obtenção de compostos naturais semi-sintéticos visa contornar essas adversidades para otimização de seu efeito no organismo e redução de efeitos colaterais (CHIN; FERREIRA, 1999). Para tanto, o método mais utilizado é a modificação molecular, onde inicialmente são empregadas adições de grupos que conferem diferente grau de hidrofobicidade ou grupos doadores e/ou aceptores de elétrons (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

A aspirina (ácido acetilsalicílico) talvez seja o exemplo mais ilustre de droga semi-sintética, a qual através da acetilação química do ácido salicílico (extraído da planta *Salix* sp.) demonstrou menor efeito tóxico (MAHDI et al., 2006). Na quimioterapia antitumoral há compostos semi-sintéticos utilizados para diferentes cânceres, tais como, câncer de mama, de ovário, de fígado, cólon e leucemia (NEWMAN; CRAGG, 2007; REDDY; ODHAVA; BHOOLAB, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Óleos essenciais e compostos químicos

Os óleos essenciais e os compostos químicos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Eder Lenardão do Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), do Instituto de Química da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os óleos são produtos comerciais obtidos do Pólo Oleoquímico da UNIJUÍ, enquanto os compostos químicos foram produzidos pelo LASOL.

Os óleos essenciais de capim-limão (*C. citratus*) e de citronela (*C. nardus*) foram diluídos em etanol absoluto (Merck). Diluições logarítmicas base dois, foram feitas a partir do óleo puro e expressos em valores de porcentagem total de óleo. A análise cromatográfica realizada pela Central Analítica do Pólo Oleoquímico (UNIJUÍ), demonstrou que o óleo de citronela apresentou como principais constituintes o citronelal (50,07%), geraniol (13,87%) e citronelol (7,93%).

O composto (R)-citronelal (Fig. 6) foi obtido através de destilação, e posterior purificação, do óleo essencial de citronela. Através do processo de aminação redutiva, o composto sofreu modificações estruturais (conforme JACOB et al., 2009), sendo denominado C37A (Fig. 7).

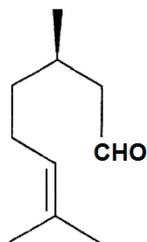


Figura 6 – R-citronelal

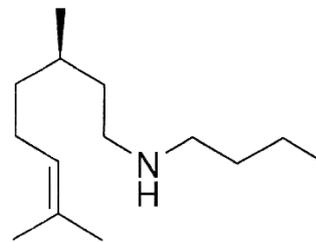


Figura 7 – C37A

A massa dos químicos foi aferida em balança de precisão e a seguir, esses foram diluídos em etanol absoluto (Merck). As diluições foram feitas do mesmo modo que as dos óleos essenciais e os valores foram expressos em mM.

3.2 Cultivo celular

A linhagem celular de câncer de mama humano, MCF-7 (ATCC HTB-22), e a linhagem de tecido epitelial de rim de macaco-verde (*Cercopithecus aethiops*), Vero (ATCC CRL-1586), foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Núcleo de 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 CO₂.

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

3.3 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 substituído por meio com 1,5% SFB contendo diluições dos produtos 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.

3.3.1 Coloração por Cristal Violeta

3.3.1.1 Princípio

O ensaio de coloração por cristal violeta é um método colorimétrico que se baseia na quantificação celular pela afinidade do corante em se associar a estruturas nucleares. Dessa forma, as células viáveis unem-se ao corante e após sua solubilização, a medida da densidade óptica do produto corado extraído corresponde a quantidade das mesmas (VANDERSICKEL et al., 2010).

Esse método tem sido utilizado para a quantificação da viabilidade celular em diversos testes, sendo mais comumente aplicado para a determinação do efeito citotóxico de produtos químicos, fármacos e toxinas originárias de patógenos (CASTRO-GARZA et al., 2007).

3.3.1.2 Método

Baseado no protocolo previamente descrito por Sanford et al. (1951), as cavidades foram lavadas com *phosphate buffered saline* (PBS) e a placa incubada por 10 min 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 10 min de incubação, a solução é 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 (cerca de 10 min.), e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro (TERMOPLATE-TPreader) à 570 nm.

3.4 Cálculo dos parâmetros de citotoxicidade

A medida da viabilidade celular após a exposição a diferentes concentrações de óleos foi realizada por:

$$\% \text{Viabilidade celular} = \frac{\text{densidade óptica de células tratadas} \times 100}{\text{densidade óptica do controle celular}}$$

Valores de IC_{50} (concentração inibitória 50%) foram calculados através das curvas de viabilidade celulares, por regressão não-linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.

3.5 Índice de seletividade (IS)

Através desse índice, é analisada a capacidade de um composto em apresentar seletividade entre células tumorais e não tumorais, para assim verificar seu potencial na terapia antitumoral. Para isto, realiza-se a divisão entre os valores de IC_{50} estabelecidos para cada composto nas linhagens tumorais e não tumorais.

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ célula não tumoral}}{IC_{50} \text{ célula tumoral}}$$

Caso o valor resultante da operação de divisão seja ≥ 2 , o composto é considerado seletivo, uma vez que as células tumorais apresentam maior sensibilidade ao mesmo (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991).

3.6 Análise Estatística

Foram realizados quatro ensaios independentes, sendo cada um em triplicata. A análise estatística dos resultados foi feita por análise de variância (ANOVA) e Teste-T. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Preparo dos óleos e compostos

Os óleos e compostos químicos, diluíram-se em etanol absoluto, possibilitando sua aplicação de forma solubilizada no meio de cultivo celular.

4.2 Viabilidade celular

A densidade celular de $1,5 \cdot 10^{-4}$ células/0,1mL/cavidade demonstrou crescimento celular adequado para ambas linhagens celulares, não havendo crescimento excessivo nas cavidades da microplaca. Esse fato proporcionou a avaliação das diferentes absorbâncias obtidas no teste.

O método de detecção de viabilidade celular utilizado no presente trabalho demonstrou eficácia na análise, por ser possível quantificar as diferenças entre as concentrações empregadas. Além disso, revelou-se uma técnica de baixo custo e fácil execução.

4.2.1 Citotoxicidade dos óleos essenciais às células MCF-7 e Vero

A avaliação da citotoxicidade mediada pelos óleos essenciais de capim-limão e de citronela demonstrou que ambos acarretaram em diminuição da viabilidade celular quando comparados ao controle. No entanto, houve variações no efeito citotóxico entre as linhagens celulares.

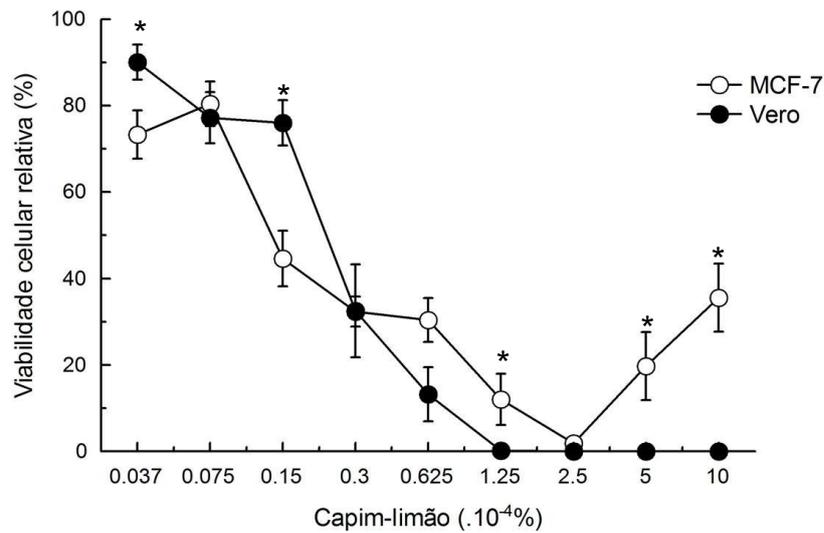
Por óleos essenciais apresentarem natureza volátil, foi necessário utilizar um método para minimizar seus efeitos sobre as outras cavidades da mesma placa. Para tanto, o uso de filme de PVC sobre as cavidades demonstrou grande eficácia, uma vez que foi possível seu isolamento, visto que, o não isolamento dessas gera resultados falsos, já que as cavidades com maiores concentrações alteram as cavidades com menores concentrações, bem como os controles.

Na Fig. 8 é possível observar a viabilidade celular das células MCF-7 e Vero quando em contato por 24h com os óleos de capim-limão e de citronela.

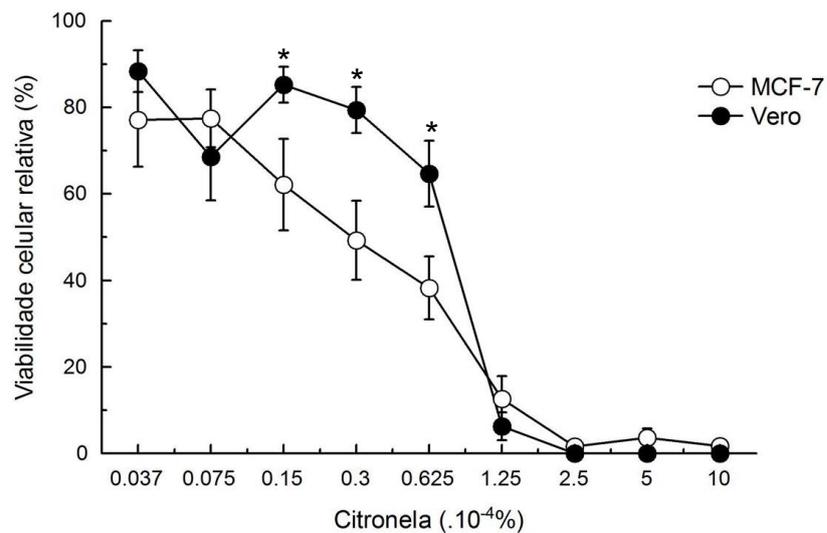
Os dois óleos testados apresentaram efeito dose-dependente na célula MCF-7, exceto as maiores concentrações do óleo de capim-limão, $5.10^{-4}\%$ e $10.10^{-4}\%$, que resultaram em diminuição do efeito citotóxico. A concentração mínima que ocasionou a inibição de 100% das células ocorreu em $2,5.10^{-4}\%$ para ambos os óleos.

Nas células não tumorais, Vero, também ocorreu efeito dose-dependente para os dois óleos. No entanto, a resposta ao aumento da dose não ocorreu do mesmo modo quando as concentrações foram dobradas. A concentração mínima a causar letalidade de todas as células foi de $1,25.10^{-4}\%$ para o óleo de capim-limão e de $2,5.10^{-4}\%$ para o óleo de citronela.

As cavidades destinadas aos controles apresentaram crescimento dentro do esperado, sendo que o excipiente do produto não apresentou alterações significativas na viabilidade celular.



A



B

Figura 8 – Viabilidade celular das células MCF-7 e Vero aos óleos essenciais de capim-limão e de citronela. Valores obtidos das médias de quatro experimentos independentes (+/- E.P.M). A: Capim-limão. B: Citronela. O teste estatístico ANOVA demonstrou que a diferença entre as células nos dois óleos, é significativa ($P < 0,05$). * $P < 0,05$.

4.2.2 Citotoxicidade dos compostos químicos às células MCF-7 e Vero

A análise da citotoxicidade causada pelos compostos químicos às duas linhagens celulares utilizadas neste trabalho revelou que a modificação da estrutura química de citronelal acarretou em grande queda da viabilidade celular.

Por ambos compostos serem originários de óleo essencial, optou-se também por isolar as cavidades com filme de PVC, o que contribuiu para a análise da citotoxicidade mediada pelas diferentes concentrações.

Uma vez que a estrutura molecular desses compostos é conhecida, foi possível a determinação de suas concentrações pela massa molar. O que não foi possível com os óleos essenciais, já que estes se constituem de uma mistura de diferentes componentes com diferentes estruturas moleculares.

A viabilidade celular das células MCF-7 e Vero quando em contato com o citronelal e seu análogo modificado, pelo período de 24h, está demonstrada na Fig. 9.

O efeito dos dois compostos químicos na célula MCF-7 ocorreu de forma proporcional à dose aplicada. No entanto, o padrão de resposta ao aumento da dose não ocorreu da mesma maneira quando as concentrações foram dobradas, havendo maior citotoxicidade em certas concentrações do que em outras. A concentração mínima que acarreta em 100% de letalidade celular foi de 400mM para citronelal e de 25mM para C37A.

A célula Vero quando exposta ao composto citronelal teve pouca queda de viabilidade, tendo efeito linear. O composto, inclusive, induziu a proliferação celular nas concentrações de 3mM, 12,5mM e 25mM. Já o composto C37A acarretou em maior efeito citotóxico a célula Vero, apresentando efeito dose-resposta. As concentrações mínimas a ocasionar letalidade de todas as células foi de 400mM para citronelal e de 100mM para C37A.

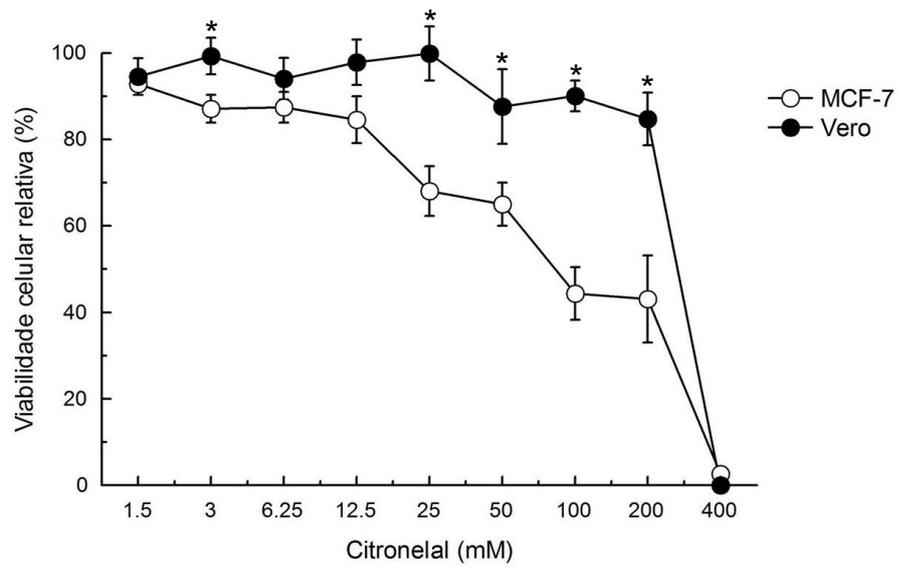
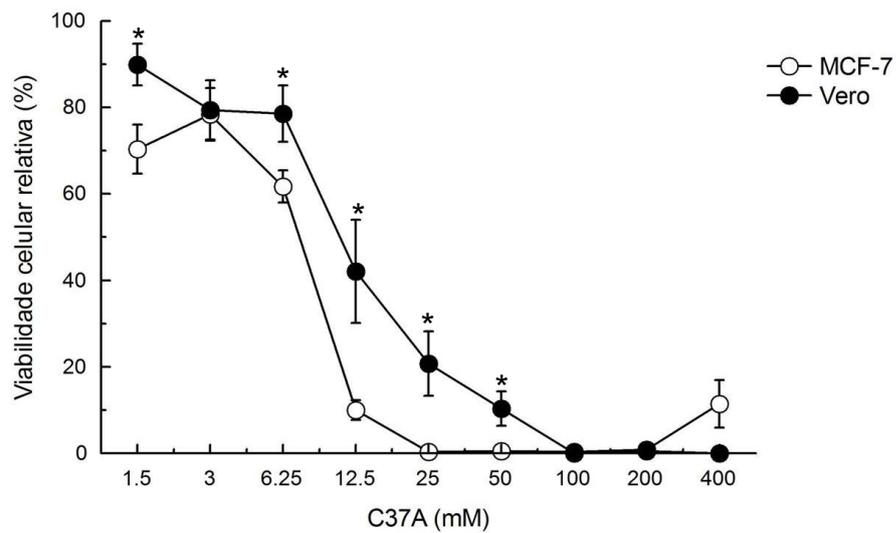
**A****B**

Figura 9 – Viabilidade celular das células MCF-7 e Vero aos compostos citronelal e C37A. Valores obtidos das médias de quatro experimentos independentes (+/- E.P.M). A: Citronelal. B: C37A. O teste estatístico ANOVA demonstrou que a diferença entre as células nos dois compostos, é significativa ($P < 0,05$). * $P < 0,05$.

4.3 Concentração inibitória 50%

O cálculo da concentração inibitória de 50% da população celular (IC_{50}) constitui uma importante ferramenta para a comparação do efeito de diferentes drogas em diferentes linhagens celulares, para que assim seja possível estimar a seletividade dos fármacos.

O óleo de citronela demonstrou maior IC_{50} , conseqüentemente menor citotoxicidade nas células Vero, quando comparado com as células MCF-7, enquanto o óleo de capim-limão teve pequena queda na IC_{50} nessa mesma linhagem celular. O óleo de capim-limão demonstrou maior efeito citotóxico que o de citronela, para ambas as linhagens celulares. Os resultados são apresentados em detalhes na Fig. 10.

Quanto aos compostos químicos, houve maior IC_{50} para ambos nas células Vero, no entanto a diferença entre as linhagens é mais evidenciada para o citronelal. Observa-se também, que o composto modificado, C37A, foi consideravelmente mais citotóxico para ambas as linhagens em comparação com o composto original, citronelal. Na Fig. 11 podem-se visualizar os resultados.

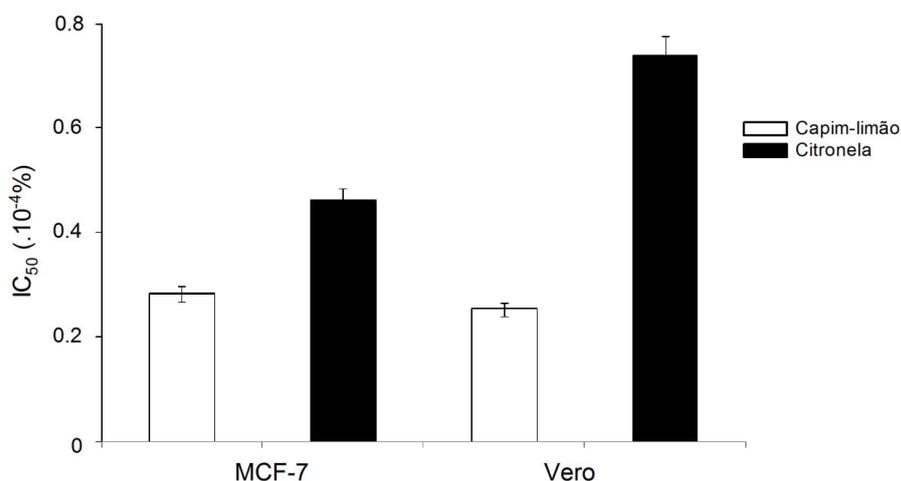


Figura 10 – Concentração inibitória de 50% da população celular (IC_{50}) +/- Erro Percentual. MCF-7 - Capim-limão: $0,28 \cdot 10^{-4}\%$; Citronela: $0,46 \cdot 10^{-4}\%$. Vero – Capim-limão: $0,25 \cdot 10^{-4}\%$; Citronela: $0,74 \cdot 10^{-4}\%$.

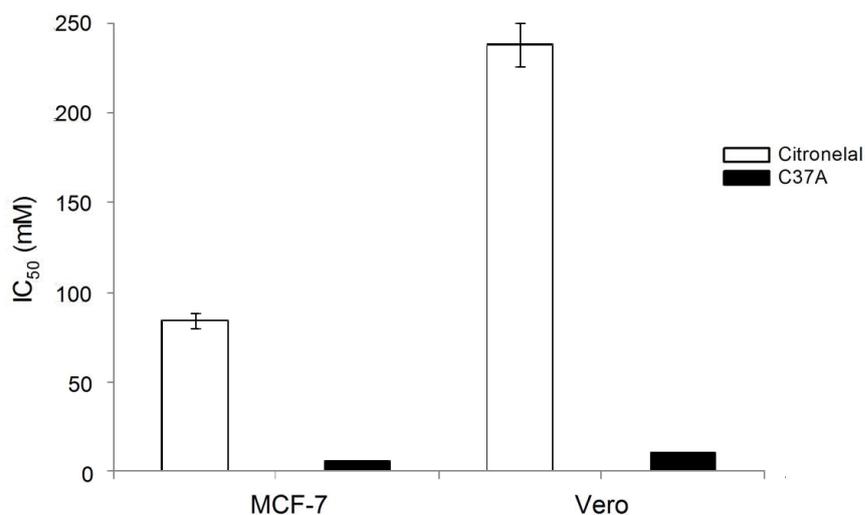


Figura 11 – Concentração inibitória de 50% da população celular (IC₅₀) +/- Erro Percentual. MCF-7 - Citronelal: 91 mM; C37A: 8,2 mM. Vero - Citronelal: 234,6 mM; C37A: 13 mM.

4.4 Índice de seletividade

Na tabela 1, observa-se o índice de seletividade (IS) para os óleos essenciais e para os compostos químicos.

Tabela 1 – Índice de seletividade (IS) dos óleos e compostos químicos entre a linhagem de câncer de mama, MCF-7, e a linhagem não tumoral, Vero.

Produtos	Índice de seletividade
Capim-limão	0,9
Citronela	1,6
Citronelal	2,8
C37A	1,7

O índice de seletividade é considerado significativo para os produtos que atingem a razão de ≥ 2 (SUFFNESS; PERUZZO, 1991).

5 DISCUSSÃO

Avaliou-se a atividade de quatro produtos, sendo dois óleos essenciais brutos, um derivado do óleo de citronela e o último uma modificação do anterior, perante uma linhagem celular de câncer de mama e outra linhagem não tumoral. Todos apresentaram alguma atividade citotóxica quando comparado ao grupo controle, porém essa atividade variou conforme o produto e a linhagem celular.

O óleo de capim-limão mostrou-se mais tóxico para as duas linhagens celulares que o de citronela. Sendo assim, o óleo de citronela necessita de quase o dobro da quantidade que o de capim-limão para promover a inibição de metade da população celular de MCF-7, enquanto para as células Vero necessita uma quantidade de três vezes maior. No entanto, o óleo de citronela (IS= 1,6) apresenta maior seletividade que o de capim-limão (IS = 0,9), porém não atinge valor significativo.

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 corrobora 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, onde concluíram que ambos óleos em concentrações inferiores a 2,5% não induziram nenhuma alteração nessas células, sugerindo que as linhagens MCF-7 e Vero são consideravelmente mais suscetíveis a ação dos mesmos. Também no mesmo estudo, os autores observaram que o óleo de capim-limão obteve maior efeito citotóxico que o de citronela, indo de acordo com os resultados do nosso trabalho.

Para Manosroi, Dhumtanoma e Manosroi (2006), os óleos de capim-limão e citronela apresentaram efeito distinto entre as duas linhagens tumorais testadas, pelo fato de em uma linhagem um dos óleos ter maior efeito citotóxico e vice-versa. No entanto, a linhagem que apresentou efeito contrário ao obtido em nosso trabalho, cresce em suspensão e não em aderência como a MCF-7 e a Vero, o que pode ter contribuído para a diferença. A linhagem que cresce em aderência, KB, de carcinoma de boca humano, apresentou efeito semelhante ao obtido neste trabalho.

Estudo de Dudai et al. (2005), demonstrou que o óleo essencial de capim-limão apresentou maior citotoxicidade que o composto citronelal em linhagens celulares de leucemia. Infelizmente, como não há informação das concentrações utilizadas, torna-se inviável a comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.

A modificação estrutural de citronelal promoveu maior atividade citotóxica já que, para promover a mesma inibição causada pelo composto original, foi necessária uma concentração cerca de 14 vezes mais elevada em MCF-7 e de 23 vezes em Vero. Porém, apesar de sua atividade citotóxica ter sido elevada, sua seletividade foi consideravelmente reduzida, uma vez que, enquanto no composto original as células tumorais eram inibidas com uma concentração três vezes menor ($IS= 2,8$), essa razão foi inferior a dois para o composto modificado ($IS= 1,7$). No entanto, é importante salientar que o composto C37A é um produto inédito que demonstrou importante efeito citotóxico.

Contrariamente ao presente trabalho, Mesa-Arango et al. (2009) demonstrou que o composto R-citronelal não apresentou seletividade, uma vez que acarretou maior efeito citotóxico nas células Vero quando comparado com a linhagem de câncer cervical humano, HeLa.

Surpreendentemente, quando as células de câncer de mama entraram em contato com o óleo de capim-limão mais concentrado, seu efeito citotóxico foi reduzido. O mesmo ocorreu com a maior concentração de C37A, no entanto em menor intensidade. Este fato presume que as células tumorais são inibidas em certa faixa de concentração, o que sugere, contrariamente ao pensado, que nem sempre a maior concentração será aquela a causar maior efeito citotóxico.

Acredita-se que os produtos (capim-limão e C37A) mais concentrados não apresentaram suficiente caráter hidrofóbico, inviabilizando sua entrada na membrana celular. Outra proposição é a de que teria ocorrido a acumulação de moléculas de óleo, dificultando a penetração na célula. No entanto, o motivo desse fenômeno não está esclarecido, restando apenas teorias que devem ser esclarecidas com estudos mais detalhados, utilizando outras técnicas de análise e até outras linhagens celulares.

Nas plantas, os homens encontram, desde a antiguidade, uma fonte de terapia natural de fácil acesso, utilizando-as para o tratamento de diversas enfermidades. No entanto, contrariando a ideia de que o natural é sempre o mais indicado por apresentar pouco ou quase nenhum efeito colateral, cada vez mais são encontrados produtos com efeitos indesejáveis àqueles que buscam cura de sua enfermidade. Por esse motivo, os derivados naturais necessitam de estudos aprofundados, e como demonstrado nesse trabalho os óleos e compostos químicos ditos como fármacos naturais, podem, muitas vezes, acarretar em efeito inespecífico, atingindo células normais e ocasionando fatores indesejáveis (neutropenia, ulcerações orais, diarreia, perda de cabelo, e dano ao nervo e ao rim (WHO, 2008)) para o paciente. Sendo assim, estudos devem ser continuados para a melhor avaliação do efeito causado pelos óleos essenciais e compostos utilizados neste trabalho, viabilizando sua utilização como possíveis fármacos antitumorais.

6 CONCLUSÕES

- Os quatro produtos testados apresentaram efeito citotóxico em ambas as linhagens celulares;
- A modificação do citronelal aumentou sua atividade citotóxica, mas diminuiu sua seletividade;
- Dentre os quatro produtos analisados, o único a apresentar seletividade significativa foi o citronelal original;

7 REFERÊNCIAS

AKHILA, A. **Essential oil-bearing grasses: the genus *Cymbopogon***. United States: CRC Press, 2010. 245p.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Cancer. In: **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed. Garland, 2002. p. 3814-3937.

American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010. Atlanta: American Cancer Society, 2009. Disponível em: <<http://www.cancer.org>> Acesso em: 24 set 2010.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2008. Atlanta: American Cancer Society, 2010. Disponível em: <<http://www.cancer.org>> Acesso em: 24 set 2010.

BAKKALI, F.; AVERBECA, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BILLERBECK, V. G. de; ROQUE, C. G.; BESSIERE, J.; FONVIEILLE, J.; DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p.9–17., 2001.

BUSS, A. D.; BUTLER, M. S. Natural Products as Drugs and Leads to Drugs: The Historical Perspective. In: **Natural Product Chemistry for Drug Discovery**. RSC Biomolecular Sciences, 2010. P. 3-24.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 2, p. 162-95, 2005.

CASTRO-GARZA, J.; BARRIOS-GARCÍA, H. B.; CRUZ-VEGA, D. E.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; CARRANZA-ROSALES, P.; MOLINA-TORRES, C. A.; VERA-CABRERA, L. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 733–737, 2007.

CASTRO, H. G. de; PERINI, V. B. de M.; LEAL, A. B.; SANTOS, G. R. dos; CASTRO, T. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

CASTRO, L. O. de ; RAMOS, R. L. D. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. , capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack. , capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. Porto Alegre: **FEPAGRO**, 2002. 31p.

CASTRO, N.E.A.; CARVALHO, G.J.; CARDOSO, M.G.; PIMENTEL, F.A.; CORREA, R.M.; GUIMARÃES, L.G.L. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.1, p.70-75, 2008.

CECHINEL FILHO, V.; ROSENDO, A. Y. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v.21, n.1, p.10-27, 1998.

CHAOUKI, W.; LEGER, D. Y.; LIAGRE, B.; BENEYTOU, 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.

CHIN, C. M.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química nova**, v. 22, n. 1, p.75-84, 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as source of anticancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.72-79, 2005.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 55, n. 15, p. 6300–6308, 2007.

DUDAI, N.; WEINSTEIN, Y.; KRUP, M.; RABINSKI, T.; OFIR, R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Plant Med**. 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.

GIORDANO, A.; NORMANNO, N. **Breast Cancer in the Post-Genomic Era**. United States: Humana Press, 2009. 230p.

GLOBOCAN. Cancer Incidence and Mortality Worldwide, 2008. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>> Acesso em: 24 set 2010.

Instituto Nacional de Câncer. Câncer de mama. Disponível em: ≤ http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=336> Acesso em: 24 jun 2010.

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/>> Acesso em: 08 jan 2010.

JACOB, R. G.; RADATZ, C. S.; AMARAL, R. C.; PERIN, G.; LENARDÃO, E. J. Solvent-free, one-pot reductive amination of aldehydes using dry Al₂O₃ and NaBH₄. In: Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2009, Book of Abstracts. 13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2009. p. 165-165.

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.

LENARDÃO, E. J.; BOTTESELLE, G. V.; AZAMBUJA, F. DE; PERIN, G; JACOB, R. C. Citronellal as key compound in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, n.803, p. 6671–6712, 2007.

LI, C. I. **Breast Cancer Epidemiology**. 1.ed. United States: Springer, 2010. 417p.

MA, X.; WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1136-1142, 2009.

MAHALWAL, V. S.; ALI, M. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 73–76, 2003.

MAHDI, J. G.; MAHDI, A. J.; MAHDI, A. J.; BOWEN, I. D. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. **Cell Proliferation**, v. 39, n. 2, p. 147–155, 2006.

MANOSROI, J.; DHUMTANOMA, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letters**, v.235, p.114–120, 2006.

MESA-ARANGO, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio De Janeiro, v.104, n.6, p. 878–884, 2009.

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

NEWMAN, J. D.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.

NHU-TRANG, T. T.; CASABIANCA, H.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. **Anal Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 7-8, p.2141-52, 2006.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, p.549–553, 2010.

OSATO, S. Chemotherapy of human carcinoma with citronellal and citral and their action on carcinoma tissue in its histological aspects up to healing. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 86, n.2, p.102-47, 1965.

PUATANACHOKCHAIA, R.; KISHIDAA, H.; DENDAA, A.; MURATAA, N.; KONISHIA, Y.; VINITKETKUMNUENB, U.; NAKAEE, D. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer Letters**, v. 183, p. 9–15, 2002.

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.

RAHIMAN, M. H. F.; HAMZAH, H. A.; TAJJUDIN, M.; TAIB, M. N. Small-Scale Steam Distillation Plant for *Cymbopogon Nardus* Essential Oil Extraction. Proc. Student Conference on Research and Development (SCOREd 2008), Johor Bahru, Malaysia, 2008.

RANAWEERA, S. S.; DAYANANDA, K. R. Mosquito-larvicidal activity of ceylon citronella (*Cymbopogon nardus* L.) Rendle oil fractions. **Journal of the National Science Council of Sri Lanka**, v.24, p.247–252, 1997.

REDDY, L.; ODHAVA, B.; BHOOLAB, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p.1–13, 2003.

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

ROSES, D. F. **Breast Cancer**. 2 ed. United States: Elsevier, 2005. 786p.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, n 3/4, 2008.

SAUTER, E. R.; DALY, M. B. **Breast Cancer Risk Reduction and Early Detection**. United States: Springer, 2010. 248p.

SPENCER, J. C. A silent killer. In: **Deadly diseases and epidemics: Cervical cancer**. United States: Chelsea House, 2007. p. 10-15.

SUAHEYUN, R.; KINOUCI, T.; ARIMOCHI, H.; VINITKETKUMNUEN, U.; OHNISHI, Y. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane- induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. **Carcinogenesis**, v.18, n.5, p.949-55, 1997.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed). **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**, v. 6. Academic Press, London, 1990, p.71-133.

VANDERSICKEL, V.; SLABBERT, J.; THIERENS, H.; VRAL, A. Comparison of the colony formation and crystal violet cell proliferation assays to determine cellular radiosensitivity in a repair-deficient MCF10A cell line. **Radiation Measurements**, "Article in Press", 2010.

VINITKETKUMNUEN, U.; PUATANACHOKCHAI, R., KONGTAWELERT, P.; LERTPRASERTSUKE N.; MATSUSHIMA, T. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in Salmonella mutation assay. **Mutation Research**, v.341, n.1, p.71-75, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Cancer Report, 2008. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2008. 203p.

*Trabalho formatado segundo "Manual de normas da UFPel para Teses, Dissertações e Trabalhos Acadêmicos" - Pelotas, 2006