



## AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Eremanthus erythropappus* SOBRE CÉLULAS K-562

Alessanie Ayumi Morita Gonçalves Pereira<sup>1</sup>, Orlando Carvalho de Lima Filho<sup>1</sup>, Iasmin Ramos da Silva<sup>1</sup>, Claudinei Alves da Silva<sup>2</sup>, Adalberto Manoel da Silva<sup>3</sup>, Alane Pereira Cortez<sup>4</sup>, Marize Campos Valadares<sup>4</sup>, Michelle Rocha Parise<sup>1\*</sup>

1 Laboratório de farmacologia e fisiologia, Universidade Federal de Jataí, Jataí, GO, Brasil.

2 Laboratório de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal de Jataí (UFJ), Jataí, GO, Brasil.

3 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, Campus Araquari, Araquari, SC, Brasil.

4 Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil.

\*Autora correspondente: Michelle Rocha Parise, Câmpus Jatobá - Cidade Universitária

BR 364, km 195, nº 3800 Jataí-Goiás-Brasil. CEP 75801-615. e-mail: microcha123@ufg.br. Telefone: 64-36068234.

### RESUMO

A leucemia mielóide crônica, neoplasia mieloproliferativa maligna, caracteriza-se por alterações no desenvolvimento de linhagens granulares. As terapias disponíveis apresentam limitações, fazendo-se necessária a busca por tratamentos alternativos. A *Eremanthus erythropappus* (EE), destaca-se pela produção do óleo essencial (OE) rico em alfa-bisabolol ( $\alpha$ -B), substância com propriedades antitumorais. Este trabalho investigou a ação citotóxica do OE de EE sobre células K-562 e fibroblastos 3T3, e a ação do  $\alpha$ -B isolado sobre os fibroblastos 3T3. As células K-562 e 3T3 foram cultivadas com diferentes concentrações do OE e do  $\alpha$ -B isolado. A avaliação do potencial citotóxico foi realizada pela redução do sal tetrazólico após 24 horas de exposição. Observou-se que as células testadas são sensíveis de forma concentração-dependente aos efeitos tóxicos dos produtos testados após 24 horas de exposição. Entretanto, apesar do OE ter 88% de  $\alpha$ -B, seu perfil de citotoxicidade difere em relação ao  $\alpha$ -B isolado, sendo este capaz de exercer menor efeito citotóxico sobre os fibroblastos. Em relação ao OE, seus demais constituintes precisam ser melhor avaliados a fim de identificar qual(is) o(s) componente(s) responsável(eis) pela elevada citotoxicidade encontrada para fibroblastos 3T3.

**Palavras-chave:** Leucemia mieloide crônica. Plantas medicinais. Fibroblastos. Bioensaio.

## EVALUATION OF THE CITOTOXICITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Eremanthus erythropappus* ON K-562 CELLS

### ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia, a malignant myeloproliferative neoplasm, is characterized by the non-development of granular lineages. Despite the available therapies, these present limitations thus being necessary more effective therapies. *Eremanthus erythropappus* (EE) it is known by the production of essential oil (EO) rich in alpha-bisabolol, substance with antitumor properties. This work investigated the cytotoxic action of the EO of *Eremanthus erythropappus* on K-562 cells and 3T3 fibroblasts, as well as of isolated alpha-bisabolol ( $\alpha$ -B) towards 3T3 fibroblasts. K-562 and 3T3 cells were placed in cell culture plates with different concentrations of EO and  $\alpha$ -B isolate. The evaluation of cytotoxic potential was performed by reduction of tetrazolium salt after 24 hours exposure. It was observed that the tested cells were sensible to the toxic effects of the tested



products in a concentration-dependent way, after 24 hours exposure. However, despite the fact that the EO presents 88% of  $\alpha$ -B, its different cytotoxicity profile in relation to isolated  $\alpha$ -B, being this capable of exerting less cytotoxic effect on fibroblasts. In relation to the EO, its further constituents need to be better evaluated in order to identify which component(s) are responsible for the high cytotoxicity found towards 3T3 fibroblasts.

**Keywords:** Chronic myeloid leukemia. Medicinal plants. Fibroblasts. Biological assay.

## INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma doença hematológica caracterizada pela alteração no desenvolvimento das linhagens de leucócitos granulares, principalmente neutrófilos e corresponde de 15 a 20% de todas as leucemias, com incidência de 1 a 2 casos a cada 100.000 pessoas<sup>(1)</sup>. Em função das desvantagens associadas ao tratamento medicamentoso da LMC, existe uma crescente busca por novas drogas citotóxicas e citostáticas, com ações antitumorais, porém mais seletivas, com menor incidência de toxicidade sistêmica. Dessa forma, novos agentes quimioterápicos, especialmente de origem vegetal, que sejam menos tóxicos e/ou que possuam um espectro de atividade antitumoral mais amplo, são pesquisados.

Os óleos essenciais (OE) se originam do metabolismo secundário de plantas sendo obtido através de flores, botões, frutos, raízes, folhas, galhos, etc. Se apresentam como compostos voláteis aromáticos como terpenos e seus derivados<sup>(2)</sup>. Pertencente à família Asteraceae, a *Eremanthus erythropappus* (EE) é uma árvore heliófila nativa do Brasil, popularmente conhecida como “Candeia-da-serra”. No Brasil possui ocorrência nas regiões norte (Pará, Rondônia), Nordeste (Bahia, Ceará, Pernambuco, Sergipe), centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo)<sup>(3)</sup>.

O OE da madeira de EE apresentam uma alta concentração de alfa-bisabolol ( $\alpha$ -B) com teor de até 93,1%, sendo uma importante fonte de  $\alpha$ -B<sup>(4)</sup>. O  $\alpha$ -B apresenta diversas propriedades descritas na literatura como ação anti-inflamatória, antioxidante, anticolinesterásica, antibacteriana, antialérgica, anticancerígena e antiflogística. Além disso, diversos estudos relatam a citotoxicidade dos OE e seu potencial antitumoral, ressaltando a importância da ação terapêutica do OE de EE e de seus constituintes bioativos<sup>(5-13)</sup>, e apesar de estudo anterior avaliando o potencial citotóxico do  $\alpha$ -B sobre as células da linhagem K-562<sup>(14)</sup>, ainda não há relatos na literatura sobre a atividade do OE de EE nesta linhagem. Ainda, a razão para testar o OE de EE, mesmo sabendo de seu elevado teor de  $\alpha$ -B, baseia-se no fato de que os OE derivados de plantas podem muitas vezes apresentar melhor atividade terapêutica do que seus principais componentes isoladamente, isto talvez pela ação sinérgica entre os constituintes químicos do OE<sup>(15)</sup>.



No presente estudo avaliou-se o efeito citotóxico *in vitro* do OE de EE em células da linhagem K-562, bem como sobre as células basais da linhagem de fibroblastos 3T3. Os fibroblastos 3T3 foram escolhidos para o presente estudo pois, segundo estudos de validação realizados pelo *National Toxicology Program* (NTP), *Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* (NICEATM) e pelo *European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), estes são uma das linhagens recomendadas para a realização de testes de citotoxicidade, os quais devem ser rotineiramente considerados antes da realização de estudos de toxicidade aguda camundongos<sup>(16)</sup>.

Dessa forma, sabendo-se que o OE extraído da madeira da EE é rico em  $\alpha$ -B e que este, por sua vez, tem propriedades antitumorais já descritas na literatura, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito citotóxico do OE de EE sobre a linhagem celular leucêmica K-562, visto que não há registros na literatura da ação citotóxica do referido OE sobre esta linhagem, além de investigar o efeito do OE e EE e do  $\alpha$ -B isolado na viabilidade de fibroblastos 3T3.

## METODOLOGIA

### Aspectos éticos

O presente estudo dispensa aprovação pelo Comitê de Ética, já que foram utilizadas linhagens celulares estabelecidas e imortalizadas em laboratório.

### Obtenção do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* e do alfa-bisabolol

O OE extraído do caule da EE foi gentilmente cedido pela empresa Atlântica S.A. A madeira colhida no campo ou no manejo sustentado passou por picador para tornar o material particulado com baixa granulometria, de modo a facilitar a extração do OE. Após picada, foi colocada em dornas e submetida à extração por arraste de vapor d'água, à pressão de 0,8 a 1,8 kgf/cm<sup>2</sup>, durante 4 h. Na etapa seguinte, o OE obtido de EE foi neutralizado com uma solução alcalina e enviado para um destilador onde foi separado do hidrolato<sup>(17)</sup>.

Ao passo que, para isolar o  $\alpha$ -B, foi utilizada uma coluna cromatográfica de 36 cm x 18 mm, empacotada com sílica-gel. Foram pesados 0,2 gramas de OE. A eluição ocorreu em gradiente de hexano:éter dietílico, com as seguintes proporções: 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5. As frações foram coletadas e posteriormente avaliadas por cromatografia de camada delgada, tendo como eluente hexano/éter etílico na proporção de 7:3 e o ácido fosfomolibdico como revelador. A identificação do analito foi realizada em comparação com um padrão obtido na Sigma-Aldrich. Foi utilizado o equipamento Clarus SQ 8S CGEM da Perkin-Elmer, espectrômetro de massas com fonte de ionização por impacto eletrônico e analisador quadrupolar simples (Q). Coluna Elite-5MS; He - fluxo de 1,0 mL/min; injetor 250°C, Coluna: 50°C, 0-4 min, aquecimento 5°C/min até 240°C,



aquecimento 15°C/min até 260°C, 260°C/2 min; volume de injeção 1,0 µL (1% p/v em Hexano); split 1:50; pressão da coluna 100 kPa; temperatura da interface 250 °C; ionização por impacto de elétrons (70 eV) operando no modo SIR. A quantidade de α-B presente na amostra de OE foi de aproximadamente 88%. A estrutura elucidada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de <sup>13</sup>C) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio 1 (RMN de <sup>1</sup>H). Os espectros foram processados no equipamento Bruker a 100 e 400 MHz, respectivamente, usando CDCl<sub>3</sub> como solvente.

### **Cultivo e manutenção das células K-562 e 3T3**

As células K-562 e 3T3 foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás - Regional Goiânia.

O cultivo das células K-562 foi realizado em frasco contendo meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado e armazenadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A suspensão celular contida no frasco foi aspirada e colocada em um tubo tipo Falcon estéril e posteriormente centrifugado por 5 min a 1.500 rpm, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI-1640 para uma posterior contagem, manutenção ou plaqueamento.

Já as células 3T3, foram cultivadas em garrafa contendo Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de SFB inativado e foram armazenadas na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Por serem aderentes, as células 3T3 foram submetidas a procedimentos a fim de desprendê-las da parede. Assim, foram adicionados 5 mL de Tampão Fosfato-Salina (PBS) lentamente, sobre as paredes da garrafa de cultura. Então, o PBS foi retirado e adicionado 1 mL de tripsina. A garrafa foi colocada na estufa a 37°C por aproximadamente 3 min, agitada a fim de desprender as células aderidas, e então observada em microscópio invertido. Posteriormente a garrafa foi levada ao fluxo laminar para a inativação da tripsina. Foram adicionados 1 mL de SFB e a garrafa foi agitada lentamente. Foram então adicionados 5 mL de meio DMEM no interior da garrafa para a lavagem da parede. Após a realização destes processos, foram retirados 5 mL do volume para posterior contagem, manutenção ou plaqueamento.

### **Contagem de células K-562 e 3T3**

A contagem de células foi realizada em contador automático (*Automated Cell Counter TC20*, Bio-Rad, Califórnia, EUA). Para tal, em um eppendorf foram colocados 10 µL de azul de Trypan 0,40% e 10 µL de suspensão celular. Após serem homogeneizados, foram colocados 10 µL na lâmina sendo então a lâmina inserida no contador. Assim, em aproximadamente 30 segundos, o



número de células e a viabilidade em porcentagem foi mostrada e, à partir do resultado, os valores foram utilizados na fórmula de Determinação do Volume Celular para realizar o plaqueamento. Através do aparelho, também foi possível obter dados da viabilidade celular, sendo o ideal resultados de viabilidade  $\geq 90\%$ .

### **Diluição seriada do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* e plaqueamento das células K-562 e 3T3**

A diluição do OE de EE foi realizada seguindo a sequência de concentrações: 200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , 3,125  $\mu\text{g/mL}$ , 1,563  $\mu\text{g/mL}$ , 0,7815  $\mu\text{g/mL}$  e 0,390  $\mu\text{g/mL}$ . A diluição foi realizada da seguinte forma: No 1º Eppendorf: foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de OE de EE e 2  $\mu\text{L}$  de DMSO a 1%, e após adicionados 158  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640, posteriormente a amostra foi colocada no vórtex (Agitador de soluções AP56 – Phoenix Lufenco); nos demais Eppendorfs: foram adicionados 100 $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640. A diluição foi realizada com passagem de 100 $\mu\text{L}$  do primeiro eppendorf para o segundo e assim consecutivamente.

As células K-562 e 3T3 foram plaqueadas em placas de cultura celular com 96 poços de fundo redondo e chato, apropriadas para células em suspensão e aderidas respectivamente, utilizando as células obtidas a partir do resultado da Determinação do Volume Celular necessário para cada poço da placa e suspendidas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB inativado. A adição do composto teste ocorreu da menor para a maior concentração, da direita para a esquerda da placa. A placa permaneceu por 24 horas na estufa a 37°C antes da adição do sal tetrazólico (MTT).

### **Avaliação da citotoxicidade das células K-562 e 3T3**

A avaliação do potencial citotóxico do OE de EE foi realizada pelo método da redução do MTT, utilizado para avaliar a viabilidade das células. Ao incubar células com o MTT, ocorre a redução desse composto pelas enzimas mitocondriais, ocorrendo uma alteração da coloração amarelada do sal para a cor arroxeadada, formando cristais de formazana. A formação dos cristais de formazana é proporcional a funcionalidade da cadeia respiratória das mitocôndrias<sup>(18,19)</sup>.

Três horas antes da revelação, as placas com as células K-562 e 3T3 foram retiradas da estufa e levadas para a capela de fluxo laminar onde foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) nos 96 poços de cada placa. Ao completar as 24 h de incubação, todo o conteúdo das placas foi desprezado, e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de DMSO para a solubilização dos cristais de formazana eventualmente formados.



As placas foram agitadas por 20 min e a leitura foi realizada a 540 nm em leitor de microplacas para obtenção de resultados. A absorbância obtida das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular. As absorbâncias obtidas para cada concentração testada foram utilizadas para calcular graficamente a relação dose-resposta (concentração x viabilidade celular), obtida através de análise de regressão linear com limite de confiança de 95% e o índice de citotoxicidade (IC) foi obtido através de equação da reta gerada.

### **Análise Estatística**

A interpretação dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANOVA), sendo 5% o nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ). Para a realização desta análise foi utilizado o teste de Tukey através do programa *Graph Pad Instat* versão 3.10. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## **RESULTADOS**

### **Purificação e caracterização do alfa-bisabolol**

Para confirmar a caracterização molecular do  $\alpha$ -B obtido do OE comercial, esse composto foi isolado da amostra por separação cromatográfica e caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) e de Hidrogênio 1 (RMN de  $^1\text{H}$ ).

O  $\alpha$ -B, óleo viscoso incolor, fórmula molecular confirmada como  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$  por espectrometria de massa em  $m/z$  222.  $^{13}\text{C}$ -RMN (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 23,36 (C1), 74,33 (C2), 40,12 (C3), 23,30 (C4), 124,59 (C5), 134,14 (C6), 17,68 (C7), 23,22 (C8), 42,99 (C1'), 22,08 (C2'), 120,56 (C3'), 131,72 (C4'), 31,05 (C5'), 26,94 (C6'), 25,72 (C7').  $^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 5,37-5,38 (H3', m, 1H), 5,11-5,15 (H5, m, 1H), 1,98-2,09 (H2', m, 2H), 1,98-2,09 (H5', m, 2H), 1,75-1,91 (H4, m, 2H), 1,69 (H7', s, 3H), 1,65 (H8, s, 3H), 1,62 (H7, s, 3H), 1,55-1,60 (H1', m, 1H), 1,47-1,52 (H3, m, 2H), 1,26-1,34 (H6', m, 2H), 1,11 (H1, s, 3H). A atribuição dos sinais de hidrogênio foi feita por comparação com os valores encontrados na literatura para  $\alpha$ -B ( $^{13}\text{C}$  RMN e  $^1\text{H}$  RMN,  $\text{CDCl}_3$ ).

### **Determinação da viabilidade celular das células K-562 e 3T3 utilizando o sal de MTT**

#### **Avaliação da citotoxicidade do solvente DMSO (Controle do veículo)**

Como o OE de EE e o  $\alpha$ -B isolado não se dissolvem em meio aquoso (RPMI-1640), sendo o DMSO empregado no presente trabalho por melhor diluir as substâncias dentre outros solventes testados. Em todos os experimentos realizados, o DMSO foi adicionado às células K-562 e 3T3 na concentração de 1% pelo período de 24 h a fim de verificar se tal concentração poderia ser



citotóxica, constituindo, portanto, um controle do solvente. Tal concentração foi a máxima concentração de DMSO utilizada para auxiliar na mistura do OE de EE e do  $\alpha$ -B isolado com o meio RPMI-1640. Verificou-se que na concentração de 1% o DMSO não foi citotóxico em relação às células K-562 incubadas somente com RPMI-1640-C (Controle Negativo) ( $p > 0,05$ ), mantendo a viabilidade celular das células K-562 na porcentagem média de  $98,75 \pm 0,74$  e das células 3T3 em  $98,86 \pm 0,40$ .

### Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *Eremanthus Erythropappus* sobre as células K-562 e 3T3

Nos ensaios para determinação da citotoxicidade, verificou-se que as células leucêmicas da linhagem K-562, bem como as células da linhagem de fibroblastos 3T3, são sensíveis ao potencial tóxico do OE de EE. Os valores de  $IC_{50}$  tanto para células K-562 quanto para células 3T3 após 24 h de exposição, estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Índice citotóxico ( $IC_{50}$ ) do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*.

Linhagem	$IC_{50}^2$
K-562 <sup>1</sup>	$27,40 \pm 2,32$
3T3 <sup>1</sup>	$3,12 \pm 0,91$

<sup>1</sup> $1 \times 10^6$  células/mL ( $1 \times 10^5$  células/cavidade).

<sup>2</sup>Valores do  $IC_{50}$  determinados por uma regressão linear, expressos em  $\mu\text{g/mL}$  e apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

Observou-se que a citotoxicidade para as células K-562 e 3T3 mostrou-se concentração-dependente e inversamente proporcional pois, à medida que a concentração aumentou, a viabilidade diminuiu (Figura 1).

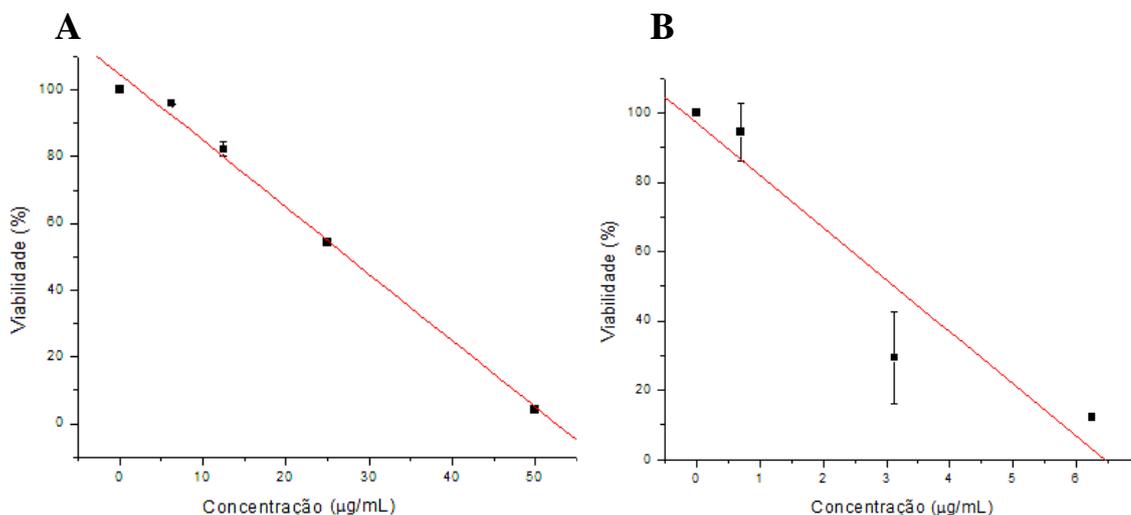




Figura 1. Relação concentração  $\mu\text{g/mL}$  x viabilidade (%) dos compostos para células K-562 e 3T3 após 24 horas de exposição ao óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*. Cada ponto e barra representam a média  $\pm$  desvio padrão, respectivamente, de três experimentos independentes realizados em triplicata. **A** células K-562 e **B** células 3T3.

### Avaliação da citotoxicidade do $\alpha$ -B sobre as células 3T3

Nos ensaios para determinação da citotoxicidade do  $\alpha$ -B, verificou-se que os fibroblastos da linhagem 3T3 são sensíveis ao potencial tóxico do  $\alpha$ -B. O valor médio do  $\text{IC}_{50}$  para as células basais após 24 h de exposição é mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Índice citotóxico ( $\text{IC}_{50}$ ) do alfa-bisabolol.

Linhagem	$\text{IC}_{50}$ <sup>2</sup>
3T3 <sup>1</sup>	30,23 $\pm$ 2,19

<sup>1</sup>- $1 \times 10^6$  células/mL ( $1 \times 10^5$  células/cavidade).

<sup>2</sup>-Valores do  $\text{IC}_{50}$  calculados determinados por uma regressão linear, expressos em  $\mu\text{g/mL}$  e apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

### DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com relação ao  $\text{IC}_{50}$  após 24 h de exposição do OE de EE às células K-562, demonstrou atividade citotóxica do OE de EE, evidenciada pela diminuição da viabilidade celular, utilizando-se a técnica colorimétrica descrita por Mosmann em 1983 para avaliação de viabilidade celular pela redução do sal de MTT<sup>(18)</sup>. Ainda, observou-se que o potencial citotóxico do OE de EE aumenta de acordo com o aumento da concentração, ou seja, é concentração-dependente (Figura 1). Da mesma maneira, o OE de EE demonstrou ser citotóxico para células 3T3 após 24 h de exposição, de uma maneira concentração-dependente. No entanto, conforme é possível observar na Tabela 1, o  $\text{IC}_{50}$  do OE de EE é menor para os fibroblastos se comparado ao  $\text{IC}_{50}$  para as células K-562, ou seja, a concentração capaz de promover a morte de 50% dos fibroblastos é aproximadamente 9 vezes menor que a necessária para promover a morte de 50% das células K-562, indicando que a concentração que teria atividade citotóxica nessas células é inviável pois seria extremamente tóxica para fibroblastos.

São escassos os estudos sobre o mecanismo de ação dos OE, visto que muitas vezes a composição química complexa da maioria destes óleos dificulta a especificidade de ação. Sendo assim, atividade citotóxica do OE não pode ser atribuída a um único mecanismo de ação, visto que os diversos grupos químicos presentes no OE envolvem diversos sítios de ação na célula.

Assim como no caso OE de EE, a incubação do  $\alpha$ -B por 24 h com as células 3T3 resultou na diminuição da viabilidade destas células de forma concentração-dependente. Por sua vez, foi



preciso usar uma concentração de  $\alpha$ -B isolado cerca de 10 vezes superior à concentração do OE de EE para exercer o mesmo efeito citotóxico sobre 50% dos fibroblastos 3T3, isto significa que o  $\alpha$ -B isolado exerceu menor efeito citotóxico sobre estas células, o que possivelmente garante maior segurança de uso do  $\alpha$ -B isolado em comparação ao OE de EE, por este assegurar maior viabilidade das células basais 3T3.

Corroborando nossos achados, Darra e colaboradores demonstraram que o  $\alpha$ -B tem atividade antitumoral específica sobre células tumorais pancreáticas sem afetar a viabilidade dos fibroblastos, o que é promissor visto que demonstra certa seletividade<sup>(20)</sup>. Ainda, Cavaliere e colaboradores, também demonstraram atividade antitumoral seletiva do  $\alpha$ -B sobre células de glioblastoma<sup>(21)</sup>. Tal atividade preferencial pelas células tumorais deve-se provavelmente ao fato do  $\alpha$ -B entrar nestas células através de microdomínios funcionais da membrana lipídica enriquecidos por lipídeos, as chamadas balsas lipídicas<sup>(20)</sup>, estruturas estas que estão presentes em maior quantidade nas células tumorais<sup>(22)</sup>.

No nosso estudo, não avaliamos a citotoxicidade do  $\alpha$ -B isolado frente as células leucêmicas K-562. No entanto, Bonifácio e colaboradores (2012) o fizeram e encontraram um  $IC_{50}$  de  $73 \pm 9 \mu M$ <sup>(14)</sup>. Em relação ao  $IC_{50}$  que encontramos do  $\alpha$ -B frente as células 3T3 ( $30,23 \pm 2,19 \mu g/mL$ ), convertendo este valor a  $\mu M$  encontramos uma concentração média de  $106,2 \mu M$ . Ou seja, o  $\alpha$ -B apresenta  $IC_{50}$  para as células K-562 inferior ao  $IC_{50}$  para as 3T3, o que significa que consegue promover citotoxicidade em 50% das células leucêmicas em uma concentração inferior à necessária pra ser citotóxico a 50% dos fibroblastos 3T3.

Baseado no exposto, podemos dizer que, apesar do OE de EE ter o  $\alpha$ -B como principal constituinte, seu perfil de citotoxicidade difere em relação ao  $\alpha$ -B isolado, sendo o  $\alpha$ -B isolado capaz de exercer maior efeito citotóxico sobre as células K-562 do que sobre fibroblastos, característica desejável e que o OE de EE não apresentou. Sendo assim, os demais constituintes do OE devem ser em parte ou totalmente responsáveis pelos efeitos citotóxicos menos pronunciados sobre células leucêmicas K-562 e mais pronunciados para as células 3T3.

A análise da composição química do OE de EE empregado no presente estudo demonstrou que 88% do OE continha  $\alpha$ -B. Este achado está de acordo com os dados obtidos por Silvério (2013), no qual o OE obtido dos galhos de EE colhida no estado de Minas Gerais, apresenta 93,1% de  $\alpha$ -B. O autor também identificou o  $\beta$ -elemeno ( $\beta$ -e) como constituinte do OE (5,6%), já os 1,3% de componentes restantes não foram identificados<sup>(4)</sup>.

Diferenças no teor e na composição química de OE extraídos de uma mesma espécie ocorrem frequentemente, uma vez que a produção de metabólitos secundários, entre eles os OE, é fortemente influenciada pelo ambiente ao qual o organismo produtor está inserido, sendo os fatores responsáveis por tais variações a sazonalidade, ritmo circadiano, idade e o



desenvolvimento da planta, bem como os diferentes órgãos vegetais, temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes, altitude, composição atmosférica e ataque de patógenos e herbívoros<sup>(23)</sup>.

Neste sentido, é possível que haja certa similaridade na composição química do OE obtido de galhos de EE e analisado no estudo de Silvério com o OE também obtido de galhos de EE e empregado em nosso estudo devido à mesma parte da planta empregada; e, especialmente, pelo fato da região de coleta ser a mesma, envolvendo, portanto, mesmas condições climáticas e geográficas, no caso o estado de Minas Gerais<sup>(4)</sup>.

O  $\beta$ -e tem sido eficaz na China no tratamento de leucemias e carcinomas no cérebro, mama, fígado, dentre outros tecidos. As maiores vantagens do  $\beta$ -e como um agente antitumoral são: (i) tem um amplo espectro de ação sobre diversos tipos de tumores, incluindo aqueles resistentes à drogas, (ii) não causa a resistência a múltiplos fármacos e pode reverter a resistência a outras drogas, (iii) tem baixa toxicidade e é, portanto, bem tolerado por pacientes com câncer. O mecanismo de ação do  $\beta$ -e permanece desconhecido. Estudos recentes demonstraram que a inibição da proliferação pelo  $\beta$ -e estava correlacionada com a interrupção de fase G2-M em células leucêmicas HL-60 e K-562. Além disso, o  $\beta$ -e demonstrou desencadear apoptose em células de glioma SHG-44 e leucêmicas K-562, e a apoptose induzida pelo  $\beta$ -e foi associada com a redução da expressão da proteína Bcl-2. Contudo, os mecanismos subjacentes à detenção de G2-M e à morte celular apoptótica desencadeada pelo  $\beta$ -e não estão elucidados<sup>(24,25)</sup>.

Caso, de fato, o OE de EE empregado em nosso estudo contenha o  $\beta$ -e e o  $\alpha$ -B, ambos poderiam agir de modo sinérgico visto que ambos possuem atividade antitumoral descrita na literatura conforme exposto na presente discussão.

O estudo de Zou e colaboradores em 2013 demonstrou que o  $\beta$ -e agiu de forma sinérgica com os fármacos quimioterápicos taxanos paclitaxel e docetaxel contra células de câncer de ovário e de próstata *in vitro*. Ainda, os autores observaram que a co-administração de  $\beta$ -e e um taxano em concentrações muito baixas ( $\mu$ m) aumentou drasticamente a taxa de formação de micronúcleo e a percentagem de interrupção mitótica em ambas as linhagens celulares de cancer do ovário testadas, em comparação com o tratamento com qualquer dos dois agentes isoladamente. Aliás, o tratamento com  $\beta$ -e por si só não causou um aumento significativo na taxa de formação de micronúcleo ou na percentagem de interrupção do ciclo celular em comparação com as taxas nas células de controle não tratado. Consistente com estes dados, o tratamento das células com  $\beta$ -e mais um taxano reduziu notavelmente a viabilidade celular e aumentou a apoptose celular. Um mecanismo que foi proposto pelos autores para explicar a eficácia citotóxica reforçada deste tratamento de combinação é um aumento induzido por  $\beta$ -e no influxo de taxanos nas células cancerosas através do aumento de sua permeabilidade, os autores também



propuseram que o  $\beta$ -e pode competir com os taxanos por sítios na bomba de efluxo, aumentando, portanto, o acúmulo intracelular e a atividade dos taxanos ou ainda, levantam que a ação antitumoral sinérgica do taxano com o  $\beta$ -e pode resultar em indução da apoptose e maior bloqueio do ciclo celular<sup>(26)</sup>.

Com base neste estudo, é possível que o  $\beta$ -e aumente o influxo do  $\alpha$ -B nas células K-562 e 3T3, ou que haja competição com o  $\alpha$ -B por sítios na bomba de efluxo, de modo que a atividade citotóxica do OE de EE seja mais pronunciada nas linhagens celulares testadas comparado ao  $\alpha$ -B isolado.

Considerando os resultados apresentados, é importante ressaltar que os dados de experimentação *in vitro* não devem ser comparados com os processos que ocorrem em um organismo vivo. No processo de incubação *in vitro* há um acúmulo de metabólitos no meio de cultura devido à ausência das vias de biotransformação e excreção como normalmente ocorre *in vivo*, causando efeito nocivo que pode superestimar a toxicidade de substâncias<sup>(27)</sup>. Sendo assim, testes *in vitro* apenas auxiliam e direcionam a realização de novas pesquisas farmacológicas de maior complexidade. Resultados de testes *in vitro* devem ser analisados apenas como parte dos ensaios necessários para aplicação terapêutica dos compostos e para posteriores testes *in vivo*.

## CONCLUSÃO

Nossos achados permitiram concluir que os tipos celulares testados (células leucêmicas K-562 e fibroblastos 3T3) são sensíveis aos efeitos tóxicos do OE de EE e que os fibroblastos 3T3 são sensíveis ao  $\alpha$ -B, sendo que tais efeitos mostraram-se ser concentração dependente após 24 h de exposição. No entanto, apesar do OE de EE ter o  $\alpha$ -B como principal constituinte, seu perfil de citotoxicidade difere em relação ao  $\alpha$ -B isolado, sendo o  $\alpha$ -B isolado capaz de exercer menor efeito citotóxico sobre os fibroblastos 3T3, característica desejável e que o OE de EE não apresentou. No que diz respeito ao OE de EE, os demais constituintes do OE precisam ser avaliados isoladamente ou de forma combinada com o  $\alpha$ -B a fim de identificar qual(is) o(s) componente(s) responsável(is) pela elevada citotoxicidade encontrada para fibroblastos 3T3.

## Agradecimentos

Agradecemos às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEG pelo apoio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sossela FR, Zoppas BCA, Weber LP. Leucemia mieloide crônica: aspectos clínicos, diagnóstico e principais alterações observadas no hemograma. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2017; 49(2): 127-130.

PARISE MR. Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial de *eremanthus erythropappus* sobre células k-562. Revista Saúde & Ciência online, v. 10, n. 1, (janeiro a abril de 2021). p. 58-70.



2. Santos GG, Trindade RC, Alves JAB, Santos PO, Alves PB, Blank AF, Carvalho LM, Aquino LCL. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjeriço gente a bactérias de carnes bovinas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 2010; 21(4): 529-535.
3. Loeuille B. *Eremanthus* in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015 [Acesso em 25 de agosto de 2020] Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5312>.
4. Silvério MS, Vieira GDV, Pinto MAO, Alves MS, Sousa OV. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeish (Asteraceae). *Molecules*. 2013; 18(8): 9785-9796.
5. Aragão L, Fernandes SSL, Malmann V, Facco JT, Matos MFC, Cabral MRP, et al. Chemical composition and evaluation of antitumoral activity of leaf and root essential oils of *Conyza canadensis* (Asteraceae). *Orbital: Eletron. J. Chem.* 2018; 11(5): 284-291.
6. Costa ER, Louro GM, Simionatto S, Vasconcelos N, Cardoso CAL, Mallman V, et al. Chemical composition, antitumoral and antibacterial activities of essential oils from leaves and stem bark of *Nectandra lanceolata* (Lauraceae). *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 2017; 20(5): 1184-1195.
7. Filho OCL, Pereira AAMG, da Silva CA, da Silva AM, Valadares MC, Cortez AP, Parise MR. Avaliação do óleo essencial de *Eremanthus erythropappus* sobre células de câncer mamário MCF-7. *Braz. J. Hea. Rev.* 2020; 3(3): 4699-4727.
8. Cavaliere E, Rigo A, Bonifácio M, Prati AC, Guardalben E, Bergamini C, et al. Pro-apoptotic activity of  $\alpha$ -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. *J. Transl. Med.* 2011; 9(45): 1-13.
9. Fang D, Wang H, Li M, Wei W.  $\alpha$ -bisabolol enhances radiotherapy-induced apoptosis in endometrial cancer cells by reducing the effect of XIAP on inhibiting caspase-3. *Biosci. Rep.* 2019; 39(6): BSR20190696.
10. Song WU, Leilei P, Hongyang S, Qian PL, Shaofei C. Anticancer effects of  $\alpha$ -bisabolol in human non-small cell lung carcinoma cells are mediated via apoptosis induction, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion and upregulation of P13K/AKT signalling pathway. *J. BUON.* 2018; 23(5): 1407-1412.
11. Cantuaria VL. Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish (Asteraceae). [Dissertação]. Diamantina: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2018.
12. Fernandes CC, Andrade PM, dos Santos TCL, Santiago MB, Pagotti MC, Crotti AEM, Martins CHG, Magalhães LG, Miranda MLD. 'In vitro' evaluation of anticaries, antimycobacterial, antileishmanial and cytotoxic activities of essential oils from '*Eremanthus erythropappus*' and of alpha-bisabolol, their major sesquiterpene. *Aust. J. Crop. Sci.* 2020; 14(2): 1835-2693.
13. Da Silva AP, Martini MV, De Oliveira CM, Cunha S, De Carvalho JE, Ruiz AL, et al. Antitumor activity of (-)-alpha-bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45: 2987-2993.
14. Bonifácio M, Rigo A, Guardalben E, Bergamini C, Eri E, Fato R, et al.  $\alpha$ -bisabolol is an effective proapoptotic agent against BCR-ABL+ cells in synergism with imatinib and nilotinib. *PLoS One.* 2012; 7(10): e46674.



15. Probst IS. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. [Dissertação] Botucatu: Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2012.
16. Organization for economic co-operation and development, 2010. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, 129.
17. Longhi PR, Souza AJD, Garcia RF, Piovezan VR. Estudo de caso do processo de extração do óleo essencial da madeira de candeia no sul de minas gerais. FLORESTA 2009; 39(3): 555-570.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol Methods. 1983; 65(1-2): 55-63.
19. Reinke A. Avaliação da viabilidade celular e produção de espécies reativas de oxigênio de células GL261 expostas a temozolamida associada a nanopartículas de ouro. [Dissertação]. Criciúma: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2019.
20. Darra E, Abdel-azeim S, Manara A, Shoji K, Maréchal JD, Mariotto S, et al. Insight into the apoptosis-inducing action of  $\alpha$ -bisabolol towards malignant tumor cells: involvement of lipid rafts and bid. Arch. Biochem. Biophys. 2008; 476(2): 113-123.
21. Cavalieri E, Mariotto S, Fabrizi C, Prati AC, Gottardo R, Leone S, et al.  $\alpha$ -bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004; 315(3): 589-594.
22. Patra SK, Bettuzzi S. Epigenetic DNA-methylation regulation of genes coding for lipid raft-associated components: a role for raft proteins in cell transformation and cancer progression (review). Oncol. Rep. 2007; 17(6): 1279-1290.
23. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím. Nova. 2007; 30(2): 374-381.
24. Wang G, Li X, Huang F, Zhao J, Ding C, Cunningham C, et al. Antitumor effect of  $\beta$ -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. Cell. Mol. Life Sci. 2005; 62(7-8): 881-893.
25. Zhou H, Shen J, Hou J, Qiu Y, Lou Q. Experimental study on apoptosis induced by elemene in glioma cells. Ai Zheng. 2003; 22(9): 959-963.
26. Zou B, Li Q, Zhao J, Li JM, Cuff CF, Reed E.  $\beta$ -elemene and taxanes synergistically induce cytotoxicity and inhibit proliferation in ovarian cancer and other tumor cells. Anticancer Res. 2013; 33(3): 929-940.
27. Brito PFL. Síntese, caracterização e avaliação *in vivo* e *in vitro* da biocompatibilidade de nanocristais de  $\text{TiO}_2$ . [Dissertação] Uberlândia: Faculdade de Odontologia da Área de Clínica Odontológica Integrada; 2013.