ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL –
PNQM09

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DA ERVA INFESTANTE *Rhaphiodon echinus* (NEES & MART) SCHAUER

G. T. LIMA¹, C. M. R. SOUSA², P. S. PEREIRA¹, S. M. A. LIMA¹, T. G. SILVA¹ e A. E.
DUARTE²

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de
Antibióticos

²Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento
de Ciências Biológicas

E-mail para contato: georgelima299@gmail.com

RESUMO – *As ervas infestantes podem ser uma importante fonte de produtos naturais com uma atividade biológica promissora. O estudo de plantas que podem ser usadas como novos agentes terapêuticos para o tratamento de diversas doenças, parece promissor. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado e analisado por CG/MS. O teste de citotoxicidade avaliou fibroblastos NCTC 929, os quais foram semeados (5×10^4 células/poço) em placas de microdiluição de fundo plano de 96 poços com 100 µL de meio RPMI. Os resultados mostraram que 21 compostos foram identificados no óleo essencial, sendo o principal constituinte o γ -elemeno no óleo essencial, com 21,86% de sua composição. Além disso, o α -bisaboleno (12,82%), o óxido de cariofileno (10,61%) e o germacreno D (10,30%) também foram representativos, com concentrações superiores a 10%. A citotoxicidade foi considerada alta em concentrações mais altas. O óleo essencial de *R. echinus* na concentração de 250 µg/mL, evidenciou que os fibroblastos exibiram 100% de mortalidade, enquanto o mesmo efeito foi obtido com nifurtimox (droga referência). A espécie pode ser uma fonte importante na busca de agentes novos e seletivos para o tratamento de doenças tropicais.*

Palavras-chave: Erva infestante; *R. echinus*; GC–MS

ABSTRACT - *Weeds can be an important source of natural products with promising biological activity. The study of plants that can be used as new therapeutic agents for the treatment of various diseases seems promising. The essential oil was extracted by hydrodistillation in a modified Clevenger type apparatus and analyzed by GC / MS. The cytotoxicity test evaluated NCTC 929 fibroblasts, which were seeded (5×10^4 cells / well) in 96-well flat bottom microdilution plates with 100 µl of RPMI medium. The results showed that 21 compounds were identified in the essential oil, the main constituent being the γ -*

*element in the essential oil, with 21.86% of its composition. In addition, α -bisabolene (12.82%), caryophyllene oxide (10.61%) and germacrene D (10.30%) were also representative, with concentrations higher than 10%. Cytotoxicity was considered high at higher concentrations. The essential oil of *R. echinus* at a concentration of 250 μg / mL showed that the fibroblasts exhibited 100% mortality, whereas the same effect was obtained with nifurtimox (reference drug). The species may be an important source in the search for new and selective agents for the treatment of tropical diseases.*

Keywords: *Weed grass; R. echinus; GC-MS.*

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma das formas mais antigas para o tratamento de diversas doenças. Desde o início da civilização, o homem faz uso delas, pela necessidade de sobrevivência. Na China têm-se registros do cultivo de plantas medicinais que datam de 3000 a.C.; os egípcios, assírios e hebreus também as cultivavam em 2300 a.C. (NOLLA et al., 2005). A busca de soluções na natureza para o tratamento de diversas enfermidades, baseando-se sempre no conhecimento empírico, levou o homem à descoberta de possíveis aplicações terapêuticas de determinadas espécies (RIBEIRO, 1996; VIEGAS JR et al., 2006).

O Brasil é o país de maior biodiversidade e contempla a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas, quase 19% da flora mundial (GIULIETTI et al., 2005). As plantas são, inegavelmente, fontes de compostos bioativos sendo atualmente bastante utilizadas pela população de vários países, inclusive o Brasil, o qual tem rendido uma inacreditável gama de produtos vegetais e animais, chamando a atenção de pesquisadores do mundo inteiro (SALATINO et al., 2005). Conforme pesquisa realizada por Sousa (2010) é importante destacar que, apesar de toda a importância atribuída as plantas, os dados disponíveis revelam que apenas 15% a 17% foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Por sua vez, a flora da erva daninha é uma parte importante da biodiversidade que tem mostrado diferentes tipos de atividades, como antimicrobianos (BADAKHSHAN, 2009; SOUSA et al., 2012; MOTTA et al., 2013), anti-inflamatórios e antinociceptivos, anti-hiperglicêmicos (VENKATACHALAM et al., 2006) e antiparasitário (GABI BABA et al., 2011), entre outros.

A espécie *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart) Schauer, é uma planta da família Lamiaceae encontrada em vários ambientes, como lotes vagos e área de caatinga e tem sido utilizada por pessoas para tratar tosse, fadiga, dor, infecções e inflamação (MENEZES et al., 1998). As pesquisas indicam que esta planta revela um potencial farmacológico e mostrou-se ativa nos ensaios antimicrobianos (SOUZA et al., 2012), anti-inflamatórios e analgésicos, citotóxico e antioxidante (MENEZES et al., 1998). Outros estudos sobre as espécies são escassos e apenas mostram a constituição química (MENEZES; KAPLAN, 2005). Portanto, a necessidade de novos estudos para encontrar tratamentos seguros, menos onerosos e mais efetivos torna-se evidente. Este estudo tem como objetivo avaliar a citotoxicidade das espécies de ervas daninhas *R. echinus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

R. echinus foi coletado em Crato, Ceará. O material da planta foi depositado no Herbário Cariense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade Regional de Cariri URCA sob o número 7348 HCDAL.

2.2. Reagentes

A substância de resazurina de sódio foi obtida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) e armazenada a 4 °C protegida da luz. Preparou-se uma solução de resazurina com 1% de tampão de fosfato, pH 7 e foi esterilizada com antecedência por filtração. Em seguida, dissolveu-se o clorofenol vermelho-p-D-galactopiranosídeo (CPRG, Roche, Indianapolis, IN) numa solução de Triton X-100 a 0,9% (pH 7,4). Penicilina G (Ern, SA, Barcelona, Espanha), estreptomicina (Reig Jofre SA, Barcelona, Espanha) e Dimetilsulfóxido (DMSO) também foram utilizados.

2.3. Preparação do óleo essencial de *R. echinus*

O óleo essencial de *R. echinus* foi extraído de material vegetal seco submetido a hidrodestilação no aparelho *Clevenger*. Após a amostragem, as folhas foram colocadas para secar ao sol, esmagadas em pequenos pedaços e depois introduzidas em um balão volumétrico de 1L, onde foram adicionados 300 mL de água destilada. O frasco foi ligado ao aparelho *Clevenger* sob uma manta de aquecimento e o ajuste da temperatura foi realizado até o ponto de ebulição da água. Após a ebulição, começou a contar o tempo de 2 horas de ciclo de extração, totalizando 6 ciclos. Após cada ciclo de extração, o óleo contido no aparelho foi coletado com uma pipeta e armazenado em frascos âmbar e depois refrigerado. Após a extração, utilizou-se 0,02g de sulfato de sódio sulfato (Na_2SO_4) para remoção da fase aquosa presente no óleo essencial.

2.4. Composição química Análise do óleo essencial de *R. echinus*

A composição química do óleo essencial de *R. echinus* foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS) usando um equipamento Shimadzu, série QP2010. A coluna capilar utilizada era do tipo Rtx-5MS com 30 mm de comprimento por 0,25 mm de diâmetro e 0,25 mm de espessura de película. O hélio foi utilizado como gás transportador a uma taxa de 1,5 $\mu\text{g/mL/min}$. A temperatura do injetor foi de 250 °C e no detector foi de 290 °C. A temperatura da coluna variou de 60 a 180 °C aumentando 5 °C/min e posteriormente variou de 180 a 280 °C subindo 10 °C/min. O óleo essencial foi diluído na proporção 1:200 em clorofórmio, com 1 μL sendo injetado no modo split. O espectrômetro de massa foi configurado para uma energia de ionização de 70 V. A identificação de componentes individuais baseou-se na sua fragmentação da massa espectral de acordo com a sua biblioteca espectral NIST Mass 08, taxas de retenção e comparação com dados publicados (ADAMS, 2001; OGUNWANDE et al., 2003; PINO et al., 2001; SILVA et al., 2003).

2.5 Ensaio de citotoxicidade

Para medir a viabilidade celular, utilizou-se um ensaio colorimétrico com resazurina (ROLÓN et al., 2006). Os fibroblastos NCTC 929 foram semeados (5×10^4 células/poço) em placas de microdiluição de fundo plano de 96 poços com 100 μL de meio RPMI 1640 durante 24 h a 37 °C em 5% de CO_2 para que as células aderissem às placas. O meio foi substituído por diferentes concentrações de drogas em 200 μL de meio e incubado por mais 24 h. Os controles de crescimento foram incluídos. Em seguida,

adicionou-se um volume de 20 μ L de solução 2 mM de resazurina e as placas foram colocadas na incubadora por mais 3 h para avaliar a viabilidade celular. A redução da resazurina foi determinada medindo a absorbância de comprimento de onda a 490 nm e 595 nm. Durante os testes de controle com meios e medicamentos foram utilizados. Cada concentração foi testada três vezes. A citotoxicidade de cada composto foi estimada pelo cálculo da porcentagem de citotoxicidade (% C).

2.6. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD), usando o software GraphPad Prism (Versão 6.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Óleo essencial obtido e análise química

O óleo essencial das folhas secas de *R. echinus* teve um rendimento de 0,12%. Um total de 21 compostos foram identificados, a partir da análise química do óleo essencial. Os índices de retenção e quantidade relativa, listados em ordem de eluição, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de *R. echinus*.

Componentes	RT(min) ^a	(%)
β -cymeno	3.16	0.62
β -pinene	3.60	0.99
cineol	4.17	0.67
germacrene B	8.18	1.32
copaeno	8.75	1.64
Aromadendreno	8.92	4.81
α -bisaboleno	9.40	12.82
α -selineno	9.56	0.72
α -cubebeno	9.77	1.27
α -humulene	9.85	1.23
germacreno D	10.20	10.31
γ -elemene	10.40	21.83
δ -guaiene	10.48	1.17
cadin-1.4-diene	10.81	1.52
spathulenol	11.47	8.84
óxido cariofileno	11.58	10.61
viridiflorol	11.67	1.35
δ -cadinol	12.20	3.37
oxide α -bisabolol B	12.36	2.03
globulol	12.52	2.72
α -bisabolol	12.62	3.76
TOTAL (21)	-	100

As análises mostraram que o γ -elemeno era predominante no óleo essencial, contando para mais de 21,86% de sua composição. Além disso, o α -bisaboleno (12,82%), o óxido de cariofileno (10,61%) e o germacreno D (10,30%) também foram representativos, com concentrações superiores a 10%. Outros compostos foram spathulenol e aromadendrene, cujas concentrações foram superiores a 4,0%.

Os óleos essenciais são uma mistura de compostos aromáticos voláteis que possuem propriedades antimicrobianas e farmacológicas (BAKKALI et al., 2008; MONZOTE et al., 2007) com atividade antiparasitária e podem estar presentes em várias partes da planta com várias funções químicas (BAKKALI et al., 2008). No óleo essencial de *R. echinus*, várias substâncias são descritas. Esses compostos naturais encontrados são responsáveis pelas ações anti-inflamatórias e antimicrobianas (MENEZES; KAPLAN, 2006). Torres et al. (2009) avaliou a composição química do óleo essencial de folhas e frutos de *R. echinus* por GC-MS e GC-FID. Foram identificados 19 compostos, 93,8% no óleo foliar e 82,4% no óleo de frutas. Ambos apresentaram sesquiterpenos, dos quais (31,9% e 19,7%) bicyclogermacrene e (21,5% e 21,2%) de trans-cariofileno.

O óleo apresentou natureza terpênica, contendo monoterpenos e sesquiterpenos. O forte odor do óleo essencial é justificado pela presença de monoterpenos como componentes principais (CASTRO et al., 2010). O composto de β -elemeno é um sesquiterpeno, um isômero estrutural de γ -elemeno, que contribui com os aromas florais de algumas plantas e é usado como feromônios para alguns insetos.

O β -elemeno pode ser considerado um subproduto originado durante a extração do óleo essencial por hidrodestilação e análise por cromatografia gasosa, pois sob condições ligeiramente ácidas ou de aquecimento, este constituinte é facilmente obtido a partir de germacrene A (SKÖLD et al., 2004). Existe uma relação entre a atividade biológica e os compostos de terpeno porque estudos demonstram ação de tais constituintes em diferentes microorganismos causados por constituintes isolados de plantas tais como 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano (SILVA et al., 2011) e sitosterol (SANTOS et al., 2010).

3.2. Atividade citotóxica de *R. echinus* contra fibroblastos de mamíferos

O potencial citotóxico do óleo essencial das folhas de *R. echinus* contra fibroblastos NCTC929 é mostrado na Tabela 1. O óleo essencial de *R. echinus* na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, revela que os fibroblastos ficaram completamente mortos, enquanto o mesmo efeito foi obtido com nifurtimox (usado como referência) em concentrações variando de 200 a 600 $\mu\text{g/mL}$ (dados não mostrados). A ordem de eficácia para matar o fibroblasto foi: nifurtimox ($\text{IC}_{50} = 83,04 \mu\text{g/mL}$) > óleo essencial de *R. echinus* ($\text{IC}_{50} = 140,2 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Citotoxicidade do óleo essencial de *R. echinus*.

Produto Natural	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	%C	$\pm$ % SD
Óleo Essencial	500	100	0,2
	250	100	0,70
	125	25,3	1,4
	62,5	0,0	0,28
<i>R. echinus</i> : IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		140,2	0,32
Nifurtimox: IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		83,04	2,14

% C - Porcentagem de fibroblastos mortos $\pm$ % SD - Desvio padrão.

Os resultados são a média de n = 3 experimentos independentes realizados em triplicado.

Neste estudo foi avaliado a citotoxicidade de *R. echinus* utilizando fibroblastos de mamíferos. O IC₅₀ para a atividade citotóxica foi de 140,2 µg/mL, mostrando um perfil ligeiramente diferente da Nifurtimox, o fármaco padrão com 83,04 µg/mL, revelando que o óleo essencial testado era menos ativo em relação à citotoxicidade, quando comparado com os resultados encontrados por Monzote et al. (2010), com valores IC₅₀ entre 12,8 - 63,3 µg/mL, semelhante aos fármacos comumente usados.

4. CONCLUSÃO

A constituição química do óleo essencial de *R. echinus* revelou a presença de γ -elemeno (21,86%) como composto majoritário, α -bisaboleno (12,82%), óxido de cariofileno (10,61%) e o germacreno D (10,30%), com concentrações superiores a 10%. O γ -elemeno, possivelmente pode está atuando de modo isolado ou sinérgico com os demais monoterpenos e sesquiterpenos do óleo provocando citotoxicidade nas células testadas. O óleo essencial de *R. echinus* na concentração exibiu citotoxicidade a partir da concentração de 250 µg/mL em fibroblastos NCTC929.

5. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Allured Publishisng, Carol Stream, IL, 2001.

BADAKHSHAN, M.P.; SASIDHARAN, S.; RAMESHWAR, N.J. A comparative study: antimicrobial activity of methanol extracts of *Lantana camara* various parts. **Pharmacognosy Res.**, v. 1, p. 348- 351, 2009.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M.; Biological effects of essential oils - a review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, 446-475, 2008.

CASTRO, H.G.; PERINI, V.B.; SANTOS, G.R.; LEAL, T.C.A.B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. **Ver. Ciên. Agron.**, v. 41, p. 308-314, 2010.

GABI BABA, A.A.J.; ADEWUMI, V.O. Aina Phytochemical Characterization and in-vivo Anti-Malaria Activity of *Lantana camara* Leaf Extract. **Br. J. Pharmacol.**, v. 2, p. 277-282, 2011.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.V.D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p. 53-61, 2005.

MENEZES, F.S.; KAPLAN, M.A.C.; In Mixture e Analysis of Triterpenes. **Rev. Latinoam. Quim.**, v. 34, p. 37-41, 2006.

MENEZES, F.S.; KAPLAN, M.A.K.; CARDOSO, G.L.C.; PEREIRA, N.A. Phytochemical and pharmacological studies on *Rhaphiodon echinus*. **Fitoterapia**, v. 69, p. 459-460, 1998.

MONZOTE, L.; MONTALVO, A.M.; SCULL, R.; MIRANDA, M.; ABREU J. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and

antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonenses*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 49, p. 257-260, 2007.

MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; MONTALVO, A.M.; SCULL, R.; MIRANDA, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 105, p. 168-73, 2010.

MOTTA, E.V.S.; PINTO, N.C.C.; DUQUE, A.P.N.; MENDES, R.F.; BELLOZI, P.M.Q.; SCIO, E. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.15, p. 264-272, 2013.

NOLLA, D., SEVERO, B. M. A., MIGOTT, A. M. B. **Plantas medicinais**. 2 ed. Passo Fundo, RS: UPF. 2005. 72 p.

OGUNWANDE, I.A.; OLAWORE, N.O.; ADELEKE, K.A.; EKUNDAYO, O.; KOENIG, W.A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. **Flavour Fragr. J.**, v. 18, p. 136-138, 2003.

PINO, J.A.; AGUERO, J.; MARBOT, R.; FUENTES, V. Leaf oil of *Psidium guajava* L. from Cuba. **J. Essent Oil Res.**, v. 31, p. 61-62, 2001.

RIBEIRO, L. M. P. **Aspectos etnobotânicos numa área rural – São João da Cristina, MG**. 336f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Rio de Janeiro-RJ, 1996.

ROLÓN, M.; SECO, E.M.; VEGA, C.; NOGAL, J.J.; ESCARIO, J.A.; GÓMEZ-BARRIO, A.; MALPARTIDA, F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Antimicrob Agents.**, v. 28, p. 104-109, 2006.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.**, v. 2, p. 33-38, 2005.

SANTOS, S.R.L.; SILVA, V.B.; MELO, M.A.; BARBOSA, J.D.F.; SANTOS, R.L.C.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Toxic effects on and structure–toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector Borne Zoonotic. Dis.**, v. 10, p. 1049-1054, 2010.

SILVA, J.D.; LUZ, A.I.R.; DA SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.D.G.B.; MAIA, J. G.S. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. **Flavour Fragr. J.**, v. 18, p. 240-243, 2003.

SILVA, C.F.; JUNQUEIRA, A.; LIMA, M.M.; ROMANHA, A.J.; SALES JUNIOR, P.A.; STEPHENS, C.E.; SOM, P.; BOYKIN, D.W.; SOEIRO, M.N.C. In vitro trypanocidal activity of DB745B and other novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 66, p. 1295–1297, 2011.

SKÖLD, M.; BÖRJE, A.; HARAMBASIC, E.; KARLBERG, A.T. Contact allergens formed on air exposure of linalool. Identification and quantification of primary and

secondary oxidation products and the effect on skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 17, p. 1697-1705, 2004.

SOUSA, E.O.; ALMEIDA, T.S.; MENEZES, I.R.; RODRIGUES, F.F.; CAMPOS, A.R.; LIMA, S.G.; COSTA, J.G.M. Chemical composition of essential oil of *Lantana camara* L. (Verbenaceae) and synergistic effect of the aminoglycosides gentamicin and amikacin. *Rec. Nat. Prod.*, v. 6, p. 144-150, 2012.

VENKATACHALAM, S.R.; SALASKAR, A.; CHATTOPADHYAY, A.; BARIK, A.; MISHRA, B.; GANGABHAGIRATHIC, R.; PRIYADARSINI, K.I. Synthesis, pulse radiolysis, and in vitro radioprotection studies of melatoninolipoamide, a novel conjugate of melatonin and α -lipoic acid. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 14, p. 6414-6419, 2006.

VIEGAS, JR., C, BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006.