

Efeitos do óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) sobre células humanas de melanoma (SK-MEL 147) e queratinócitos (HaCaT)

Effects of essential oil from lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on human melanoma (SK-MEL 147) and keratinocyte (HaCaT) cells

Jordanna Merlin Villaverde¹; Larissa Sanches²; Vânia Aparecida Terra³; Rubens Cecchini⁴, Alessandra Lourenço Cecchini⁴, Rodrigo Cabral Luiz⁴

¹Universidade Estadual de Londrina, Programa de pós-graduação *Lato sensu* em Biologia Aplicada à Saúde, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Patológicas, Londrina – PR, Brasil.

²Universidade Estadual de Londrina, Programa de pós-graduação *Strictu sensu* em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Patológicas, Londrina – PR, Brasil.

³Pontifícia Universidade Católica, Curso de Medicina, Londrina – PR, Brasil.

⁴Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Patológicas, Londrina – PR, Brasil.

Resumo

O óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) (OECL) e alguns de seus componentes têm sido descritos como potentes agentes anticarcinogênicos, antimutagênicos e antioxidantes. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do OECL sobre células humanas de melanoma (SK-MEL 147) e queratinócitos (HaCaT) *in vitro*. Utilizando o teste de capacidade antioxidante total observamos que o OECL 1µl/ml apresentou atividade antioxidante eficiente. Todas as concentrações testadas (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 µl de extrato por ml de meio de cultura) apresentaram redução na viabilidade e da proliferação para as células SK-MEL 147 (24h de tratamento), com indução de apoptose, necrose e autofagia, de acordo com a concentração testada. Para as células HaCaT, o OECL não apresentou atividade citotóxica ou antiproliferativa. Nossos resultados demonstram que o OECL pode ser uma fonte de produtos com atividade quimiopreventiva sobre o melanoma humano. Contudo, novas pesquisas devem ser realizadas para esclarecimento dos mecanismos e substâncias responsáveis pelos efeitos observados.

Palavras-chave: óleo essencial, capim-limão, *in vitro*, melanoma.

Abstract

The essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) (OECL) and some of its components have been described as potent anticarcinogenic, antimutagenic, and antioxidant agents. Thus, the present study investigated the effects of OECL on human melanoma cells (SK-MEL 147) and keratinocytes (HaCaT) *in vitro*. Total antioxidant capacity test revealed that OECL 1 µl/ml has an efficient antioxidant activity. All tested concentrations (0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and 1 µl of extract per ml of culture medium) decreased the viability and proliferation of SK-MEL 147 cells (24 h of treatment) with induction of apoptosis, necrosis and autophagy, according to tested concentrations. For HaCaT cells, OECL showed no cytotoxic or antiproliferative activity. Our results demonstrated that OECL can be a source of products with chemopreventive activity against human melanoma. However, further research should be conducted to elucidate the mechanisms and substances involved in observed effects.

Keywords: essential oil, lemongrass, *in vitro*, melanoma.

INTRODUÇÃO

O capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, também conhecido por erva-cidreira, capim-cidreira ou *lemongrass*, é uma planta quase acaule, com folhas longas, estreitas e aromáticas, pertencente à família *Poaceae* (*Gramineae*). Esta planta é originária da Ásia e é muito cultivada em países tropicais. No Brasil, seus chás e extratos são utilizados na medicina popular como digestivos, antitussígenos, antigripais, analgésicos, antitérmicos, anti-inflamatórios das vias urinárias, diuréticos, antiespasmódicos, antialérgicos, entre outros⁽¹⁾. Além disso, o capim-limão também é utilizado na aromatização de alimentos e na indústria de perfumes e cosméticos⁽²⁾.

O citral é o princípio ativo predominante no óleo essencial de capim-limão (OECL), podendo representar de 65 a 85% dos compostos presentes⁽³⁻⁴⁾. Trata-se de uma mistura de isômeros geranial (isômero trans, α -citral) e neral (isômero cis, β -citral). Além do citral, o óleo essencial desta planta possui boas quantidades de β -mirceno e geraniol⁽⁵⁻⁶⁾, além de apresentar isoorientina, isoscoparina, sweriajaponina, isoorientina 2-O-ramnosídeo, orientina, ácido clorogênico, ácido caféico⁽⁷⁾.

Em diversos sistemas *in vitro* e *in vivo*, extratos de capim-limão ou seus compostos específicos (ex. citral, β -mirceno e geraniol) têm apresentado atividade antimutagênica, antioxidante e anticarcinogênica^(3, 7, 8-15).

O melanoma maligno cutâneo (MMC) é um tipo agressivo de neoplasia da pele, cuja incidência tem aumentado desde a década de 1970. No Brasil o melanoma corresponde a 4% dos cânceres que acometem a pele, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA). A letalidade do melanoma é elevada, porém sua incidência é baixa (2.960 casos novos em homens e 2.930 em mulheres). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul⁽¹⁶⁾. De um modo geral, o surgimento do melanoma é multifatorial e envolve fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores genéticos incluem-se o fenótipo da pele e mutações em genes que favorecem o surgimento de nevos melanocíticos⁽¹⁷⁻¹⁸⁾. Do ponto de vista ambiental, a exposição aguda à radiação ultravioleta (UV) na infância e/ou adolescência, tem sido apontados como importantes fatores de risco⁽¹⁹⁾.

A radiação UV tem forte relação com o processo de carcinogênese na pele. Dentre os diversos fatores que contribuem para esta associação, os mais importantes são a indução de processo inflamatório, imunossupressão e lesões no genoma das células epiteliais. As lesões de DNA induzidas pela radiação UV são resultantes da formação de fotoprodutos diméricos (irradiação UVB) e também pela geração de estresse oxidativo

(irradiação UVA e UVB)⁽²⁰⁻²¹⁾. Como o estresse oxidativo tem forte envolvimento no desenvolvimento de neoplasias cutâneas⁽²²⁾, o uso de antioxidantes tem sido proposto como forma de quimioprevenção dos cânceres de pele, sendo que os de origem natural são os mais promissores por também apresentarem atividade antineoplásica e antimutagênica, com baixa toxicidade⁽²³⁾.

Compreende-se por quimioprevenção do câncer, a prevenção, inibição ou reversão do câncer através do uso de substâncias naturais ou sintéticas, que podem atuar tanto no estágio de iniciação do câncer, quanto nos estágios de promoção/progressão⁽²⁴⁻²⁵⁾. A quimioprevenção do melanoma também tem sido discutida nas últimas décadas e alguns compostos já demonstraram efeitos promissores como os bloqueadores solares, redutores de gordura corporal, antiinflamatórios não esteroidais, imunomoduladores, retinóides, difluorometilornitina e T4 endonuclease V⁽²⁶⁾.

Dentro deste contexto, o OECL deve ser avaliado como possível fonte de compostos para a quimioprevenção e/ou tratamento do melanoma, por este motivo o presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* os efeitos antiproliferativos e/ou citotóxicos do OECL sobre células humanas de melanoma (SK-MEL 147), comparando os resultados com queratinócitos normais humanos (HaCaT).

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do OECL

O óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, foi gentilmente fornecido pela empresa By Samia Aromaterapia (10 ml). O extrato foi obtido por método de arraste a vapor, durante o qual 75 kg de planta fresca forneceram aproximadamente 1,4 L de óleo essencial (densidade 0,73). Os resultados da cromatografia gasosa foram fornecidos pela empresa e foram realizados pela Universidade de Caxias do Sul. Foi utilizado um Cromatógrafo a gás HP 6890 (coluna HP-Innowax) e as amostras foram diluídas em hexano na proporção de 1:10 para a determinação da composição química percentual. O óleo essencial utilizado na presente pesquisa apresentou a seguinte composição: neral (29,05%), geranial (42,03%) e mirceno (18,63%). A concentração de citral foi estimada pela soma aritmética da porcentagem de neral e geranial, obtendo-se assim 71,08%.

Para a utilização do OECL na cultura de células de melanoma humano (SK-MEL 147) *in vitro*, foi preparada uma emulsão 10%. Como agente de emulsificação foi utilizado Tween 80 (2%) e Pro-Lipo® Duo (Biotec) (quantidade suficiente para obtenção da emulsão). Foram utilizadas as concentrações 0,5; 1; 2,5; 5 e 10µl de emulsão por ml de meio de cultura (equivalentes à 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1µl de extrato/ml).

Cultura de células

As células de melanoma humano SK-MEL 147 foram semeadas 5×10^4 células/poço em placa com 24 poços em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM, Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF, Gibco®), mantidas em estufa de 5% de CO₂ umidificada a 37°C, por 24 horas para aderência nos poços e posteriormente receberam os tratamentos com OECL. Também foram utilizados queratinócitos humanos normais HaCaT, as células foram cultivadas em meio RPMI (Gibco®) suplementados com 5% SBF, e mantidas nas mesmas condições que a SK-MEL 147. Como controle de citotoxicidade utilizamos o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (F.MAIA) na concentração final de 100µM em meio de cultura.

Como controle negativo utilizamos uma mistura de Tween 80 (2%) e Pro-Lipo® Duo (Biotec) em concentração final inferior a 1% em cultura.

Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) por quimiluminescência

Para determinar a capacidade antioxidante total (TRAP), a técnica utilizada foi a descrita por Ghiselli *et al.* (1995)⁽²⁷⁾, onde os níveis de antioxidantes totais são mensurados, principalmente antioxidantes de baixa massa molecular. Neste método, o 2,2'-azo-bis (ABAP), um sistema gerador de radical alcooxil por decomposição térmica, produz fótons que são amplificados pelo luminol e medidos em um luminômetro Glomax (Turner Designs TD 20/20). A adição de antioxidantes inibe a emissão por tempo determinado, portanto utilizou-se um padrão antioxidante, o Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E).

O óleo essencial foi analisado de forma qualitativa na concentração final de 1µL/ml e os resultados foram expressos em URL (Unidade Relativa de Luz). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

Curva de proliferação e cálculo de “doubling time”

Após o tempo de tratamento com o OECL, as células foram tripsinizadas com 150 µl de tripsina 0,25% e suspendidas com mais 150 µl de meio de cultura completo. Foram realizadas coletas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas para cálculo do “doubling time” (tempo necessário para dobrar a população de células em cultura). Uma alíquota de 20 µl da suspensão celular foi misturada com 20 µl de azul de tripan 0,05% e levada para leitura em câmera de Neubauer. Foram analisados os quatro quadrantes exteriores da câmera em microscópio de luz no aumento de 100x. Para a análise da concentração de células foi utilizada a contagem do número total das mesmas nos quatro quadrantes, multiplicando pelo fator de diluição 2. Para a análise de viabilidade foram avaliadas 300 células por tratamento, considerando inviáveis as células com infiltração do azul de tripan. Para o cálculo do “doubling time” os resultados obtidos nos diversos tempos de coleta foram aplicados na fórmula do site “Doubling time online calculator” (<http://www.doubling-time.com/compute.php>).

Teste de redução do MTT

O Ensaio do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Invitrogen) segundo Mosmann (1983)⁽²⁸⁾, consiste na capacidade das enzimas mitocondriais reduzir o MTT (um sal de coloração amarela) em um sal de coloração púrpura o formazan. Após o tratamento de 24 horas, as células foram expostas ao MTT, os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO e as placas foram lidas em espectrofotômetro (Uniscience) a 540 nm. O ensaio foi realizado em três replicatas e três experimentos independentes. A porcentagem de sobrevivência celular foi calculada através da fórmula (Absorbância tratado – Absorbância branco/ Absorbância Controle – Absorbância Branco) x 100.

Dosagem de lactato desidrogenase (LDH)

Este sistema é baseado na capacidade da LDH converter lactato em piruvato e NADH, utilizando como revelador o alumen ferroso, que ao reagir com a 1,10-fenantrolina, forma um complexo colorido que pode ser lido em espectrofotômetro a 510 nm. Para o teste foi utilizado o kit comercial Desidrogenase Láctica (Doles®), a dosagem de lactato desidrogenase foi realizada no meio de cultivo após 24 horas de tratamento.

Avaliação do padrão de morte celular e autofagia

A identificação das células com padrão apoptótico ou necrótico de morte celular foi feita por análise microscópica após coloração com alaranjado de acridina/brometo de etídio adaptado de Tsuboy *et al.* (2010)⁽²⁹⁾. As células foram tratadas por 24 horas em poços contendo lamínulas de vidro. Após esse período as lamínulas foram fixadas com tampão Carnoy (Metanol: Ácido acético, 3:1) por 5 minutos. Posteriormente a lamínula foi mergulhada rapidamente em concentrações decrescentes de etanol (95% a 25%), seguida de lavagem com tampão McIlvaine (Solução de ácido cítrico 0,1 M + Solução de Fosfato dissódico 0,2 M, pH 3,5) por 5 minutos, coloração com alaranjado de acridina (0,01%)/ brometo de etídio (0,01%) por mais 5 minutos, seguido de nova lavagem com o tampão. Em cada tratamento foram analisadas 500 células em microscópio de fluorescência Olympus BX3-URA (aumento de 400x) e o experimento foi realizado em triplicata e três repetições. As células foram classificadas em: a) Normais: células com citoplasma verde e núcleo íntegros; b) Apoptóticas: células com citoplasma apresentando cariorrexe com condensação periférica da cromatina, coloração amarela ou alaranjada; c) Necróticas: células com intensa cariorrexe ou ausência de núcleo e citoplasma irregular alaranjado.

Para a autofagia, após 24 horas de tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas com monodanzilcaderina (MDC) 0,05 mM em meio de cultura e mantidas em estufa a 37 °C durante 10 minutos. As células foram imediatamente analisadas utilizando um microscópio de fluorescência Olympus fluorescência Sistema Microscópio BX3-URA (Olympus Corporation, Tóquio, Japão), com 380 e 525 nm de comprimento de onda de excitação e de emissão de filtros, respectivamente.

Análise estatística

Para todos os testes foi utilizado One Way ANOVA seguido de Dunnett, considerando significantes valores com $p < 0,05$ em relação ao controle do respectivo tipo celular. Para a análise foi utilizado o programa GraphPad 5.0.

RESULTADOS

O óleo essencial de capim-limão (concentração final de 1µl/ml) apresentou atividade antioxidante eficiente, quando comparada ao padrão antioxidante Trolox, onde 5µl de OECL apresentaram efeito equivalente a 2786 µM de Trolox. O gráfico 1 demonstra o comportamento do Trolox (linha preta) onde se observa uma importante inibição da emissão de fótons a partir do ABAP até o tempo 3000 segundos, enquanto o OECL (linhas azul, verde e rosa – repetições) apresenta uma capacidade similar de bloqueio de emissão de fótons, porém sua atividade antioxidante controla a emissão por um tempo mais prolongando, não havendo quedas bruscas de atividade antioxidante (Figura 1).

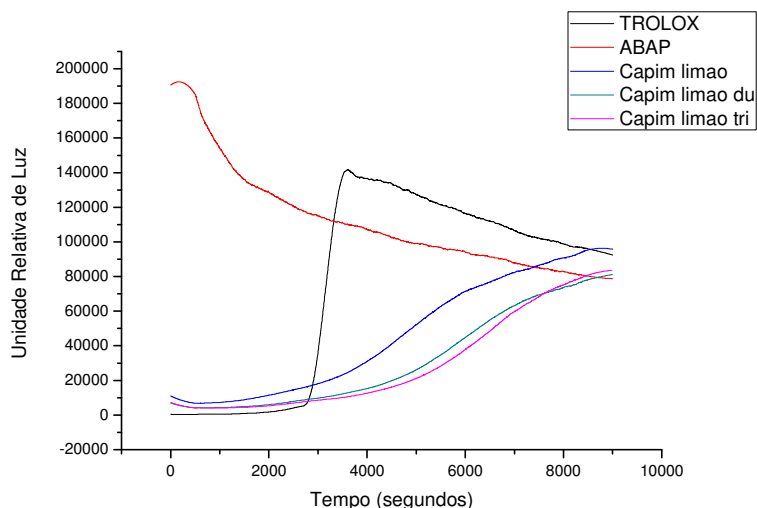


Figura 1 – Análise qualitativa da capacidade antioxidante total (TRAP) do óleo essencial de capim-limão. Os resultados estão representados a partir da média das leituras de cada concentração, do gerador de radical alcooil (ABAP) e do padrão antioxidante (Trolox).

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para as células SK-MEL 147 e HaCaT expostas a diversas concentrações de OECL. Para as células SK-MEL 147 as curvas de proliferação e testes de viabilidade celular demonstraram que concentrações de OECL iguais ou superiores a 0,25 μl de extrato/ml são capazes de aumentar o tempo de “doubling time”, chegando até mesmo a inviabilizar o cálculo do “doubling time” por promover morte de 100% das células no tempo 48h (dado não mostrado). Todas as concentrações testadas apresentaram redução na viabilidade celular em 24h de tratamento. Para as células HaCaT as concentrações testadas não apresentaram efeito citotóxico ou citostático. Para ambos os tipos celulares o controle de citotoxicidade com peróxido de hidrogênio revelou eficiência dos procedimentos adotados.

Tabela 1. “Doubling time” e viabilidade das células SK-MEL 147 (melanoma humano) e HaCaT (queratinócitos humanos) tratados com óleo essencial de capim Limão (OECL).

Cells	Treatment	Doubling Time (horas \pm S.D.)	Viabilidade celular 24h (% \pm S.D.)
SK-MEL 147	Controle	17,2 \pm 1,4	98 \pm 2
	H ₂ O ₂ 100 μM	24,5 \pm 2,1*	79 \pm 2*
	OECL 0,05 $\mu\text{l/ml}$	25,1 \pm 3,0*	65 \pm 2*
	OECL 0,1 $\mu\text{l/ml}$	29,5 \pm 2,9*	51 \pm 2*
	OECL 0,25 $\mu\text{l/ml}$	35,8 \pm 2,8*	35 \pm 1*
	OECL 0,5 $\mu\text{l/ml}$	---	22 \pm 1*
	OECL 1 $\mu\text{l/ml}$	---	19 \pm 2*
HaCaT	Control	24,0 \pm 1,1	97 \pm 3
	H ₂ O ₂ 100 μM	28,2 \pm 1,2*	86 \pm 3*
	OECL 0,05 $\mu\text{l/ml}$	24,4 \pm 1,0	97 \pm 2
	OECL 0,1 $\mu\text{l/ml}$	24,9 \pm 2,1	97 \pm 2
	OECL 0,25 $\mu\text{l/ml}$	25,1 \pm 1,6	96 \pm 2
	OECL 0,5 $\mu\text{l/ml}$	25,2 \pm 1,2	96 \pm 3
	OECL 1 $\mu\text{l/ml}$	25,2 \pm 1,5	96 \pm 3

* = estatisticamente diferente em relação ao controle ($p < 0.05$); H₂O₂ = peróxido de hidrogênio 100 μM . OECL = Óleo essencial de capim-limão. S.D. = Desvio padrão. “Doubling time” = tempo necessário para dobrar a população de células, calculado a partir dos resultados de contagem celular nos tempos 24, 48, 72 h após o tratamento. Para os tratamentos OECL 0,5 e 1 $\mu\text{l/ml}$ não foi possível estimar o “doubling time” devido à drástica redução na contagem e viabilidade celular

O teste de redução do MTT revelou que o OECL apresentou efeito citotóxico sobre células SK-MEL 147 para todas as concentrações testadas, sendo que as mesmas concentrações de OECL não apresentaram efeito citotóxico sobre as células HaCaT (Figura 2).

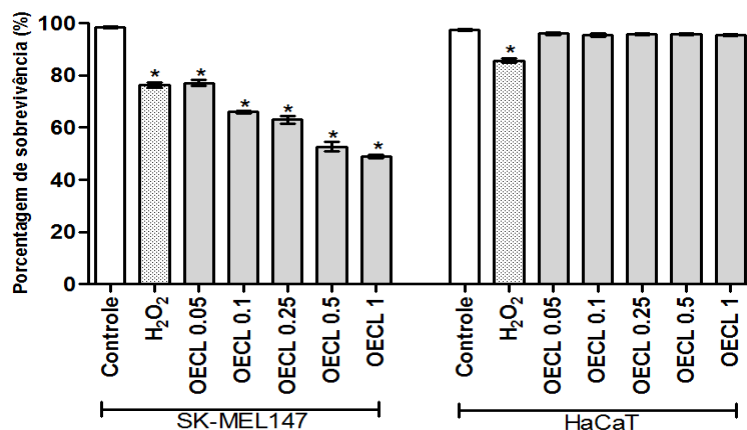


Figura 2 – Avaliação da capacidade citotóxica do Óleo Essencial de capim-limão sobre células de melanoma humano SK-MEL 147 e queratinócitos HaCaT, através do Teste de redução do MTT (24h de tratamento). O gráfico apresenta resultados das médias aritméticas das porcentagens de sobrevivência e as barras indicam o desvio padrão. Os asteriscos (*) indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. H₂O₂ = peróxido de hidrogênio 100 μ M. OECL = Óleo Essencial de capim-limão (μ l de extrato/ml de meio).

Para a dosagem de LDH liberado em meio de cultura, também observamos o aumento de liberação nas células SK-MEL 147 tratadas com OECL em todas as concentrações, sendo que para as células HaCaT não observamos alteração 24h de tratamento (Figura 3).

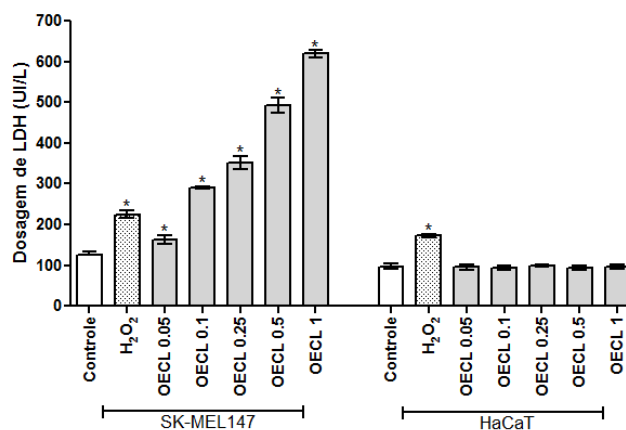


Figura 3 – Avaliação da capacidade citotóxica do Óleo Essencial de capim-limão sobre células de melanoma humano SK-MEL 147 e queratinócitos HaCaT, através da dosagem de lactato desidrogenase (LDH) em meio de cultura (24h de tratamento). O gráfico apresenta resultados das médias aritméticas das dosagens de LDH e as barras indicam o desvio padrão. Os asteriscos (*) indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. H₂O₂ = peróxido de hidrogênio 100 μ M. OECL = Óleo Essencial de capim-limão (μ l de extrato/ml de meio).

A Tabela 2 e a Figura 4 apresentam os resultados obtidos a partir da análise morfológica das células após 24h de tratamento com o OECL. Para as células SK-MEL 147 observamos que todas as concentrações de OECL testadas reduziram significativamente a porcentagem de células com padrão morfológico normal, esta redução está relacionada com o aumento de células com padrão necrótico. As concentrações de OECL 0,05 a 0,25 μl de extrato/ml foram também capazes de induzir padrão apoptótico de morte celular, sendo que concentrações mais baixas são capazes de induzir a apoptose de maneira mais eficiente do que as concentrações mais altas. As concentrações 0,5 e 1 μl de extrato/ml também foram capazes de promover vacuolização citoplasmática relacionada ao processo de autofagia. Para as células HaCaT o OECL não apresentou mudanças significativas na morfologia celular, não sendo observado também o processo de vacuolização celular.

Tabela 2 – Padrões de morte celular em células SK-MEL 147 (melanoma humano) e HaCaT (queratinócitos humanos) tratados com óleo essencial de capim-limão (OECL).

Células Tratamento	Normal (% \pm S.D.)	Apoptose (% \pm S.D.)	Necrose (% \pm S.D.)	Autofagia (%) \pm S.D.)
SK-MEL 147				
Controle	94.3 \pm 1.5	2.7 \pm 0.6	0.7 \pm 0.6	2.3 \pm 0.6
H ₂ O ₂ 100 μM	80.7 \pm 1.2*	10.0 \pm 1.7*	4.7 \pm 1.5	4.7 \pm 1.5
OECL 0.05 $\mu\text{l/ml}$	64.7 \pm 0.6*	20.0 \pm 1.7*	12.0 \pm 1.7*	3.3 \pm 0.6
OECL 0.1 $\mu\text{l/ml}$	59.0 \pm 1.7*	14.3 \pm 1.2*	24.3 \pm 2.3*	2.3 \pm 0.6
OECL 0.25 $\mu\text{l/ml}$	54.3 \pm 2.3*	9.0 \pm 1.0*	33.7 \pm 3.1*	3.0 \pm 1.0
OECL 0.5 $\mu\text{l/ml}$	52.0 \pm 1.0*	5.3 \pm 0.6	34.0 \pm 2.0*	8.7 \pm 1.2*
OECL 1 $\mu\text{l/ml}$	43.0 \pm 2.0*	2.7 \pm 0.6	41.3 \pm 1.5*	13.0 \pm 1.7*
HaCaT				
Controle	98.0 \pm 0.0	1.7 \pm 0.6	0.3 \pm 0.6	0
H ₂ O ₂ 100 μM	80.7 \pm 1.2*	12.0 \pm 2.0*	7.3 \pm 2.3*	0
OECL 0.05 $\mu\text{l/ml}$	96.7 \pm 1.5	3.3 \pm 1.5	0.0 \pm 0.0	0
OECL 0.1 $\mu\text{l/ml}$	96.3 \pm 1.2	3.7 \pm 1.2	0.0 \pm 0.6	0
OECL 0.25 $\mu\text{l/ml}$	95.7 \pm 0.6	3.7 \pm 0.6	0.7 \pm 0.0	0
OECL 0.5 $\mu\text{l/ml}$	96.0 \pm 1.0	3.7 \pm 1.2	1.0 \pm 0.6	0
OECL 1 $\mu\text{l/ml}$	96.3 \pm 1.2	3.0 \pm 1.0	2.3 \pm 2.1	0

* = estatisticamente diferente do controle ($p < 0.05$); H₂O₂ = peróxido de hidrogênio 100 μM . OECL = Óleo essencial de capim-limão. S.D. = Desvio Padrão.

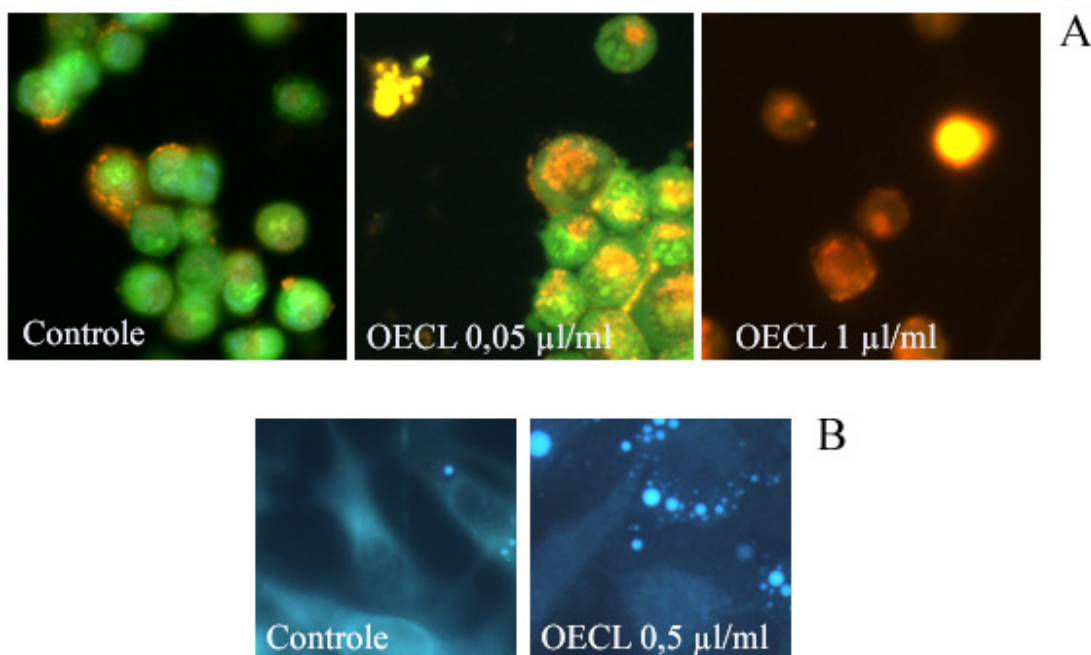


Figura 4 – Fotomicrografias das células SK-MEL 147 (400x) submetidas à coloração com brometo de etídio/alaranjado de acridina para determinação dos padrões de morte celular (A) e monodanzilcadaverina para observação de vacúolos autofágicos (B). OECL = óleo essencial de capim-limão.

DISCUSSÃO

Devido às suas propriedades medicinais, muitos produtos naturais têm sido amplamente utilizados por diversas culturas humanas. Dentre estes produtos naturais alguns são fontes de substâncias atualmente empregadas em diversas doenças, incluindo o câncer⁽³⁰⁾. O capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) é uma planta bastante comum em regiões de clima tropical e graças ao seu óleo essencial é utilizada na medicina popular, na indústria de cosméticos e alimentos⁽²⁾, sendo que a literatura aponta o citral como um importante constituinte químico deste óleo essencial⁽³¹⁾.

Uma vez que o estresse oxidativo está muito envolvido na carcinogênese do melanoma, inicialmente avaliamos a atividade antioxidante do óleo essencial de capim-limão (OECL) utilizado neste trabalho e observamos, através da técnica do TRAP, que o mesmo apresenta significativa atividade antioxidante. Cheel *et al.* (2005)⁽⁷⁾ observaram que extratos de capim-limão são capazes de inativar o radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), sequestrar o ânion superóxido e inibir a lipoperoxidação. Um importante antioxidante presente no capim-limão é o citral, sendo até mesmo utilizado em pesquisas com a finalidade de elucidar mecanismo de oxidação de composto, como no trabalho de Wang e colaboradores (1992)⁽³²⁾, que utilizaram o citral como antioxidante em uma pesquisa sobre os processos de oxidação do beta caroteno. Outros compostos presentes no capim-limão, também apresentam atividade antioxidante, tais como: a) isoorientina e a orientina, que inativam o DPPH e inibem lipoperoxidação; b) ácido caféico e clorogênico, que sequestram radical superóxido e inativam DPPH, sendo que o ácido caféico também é capaz de inibir a lipoperoxidação⁽⁷⁾; c) beta-mirceno, capaz de reduzir significativamente a genotoxicidade induzida pelo radical t-butil hidroperóxido em bactérias e células humanas em cultura⁽¹⁴⁾.

No presente trabalho observamos que o óleo essencial de capim-limão (OECL) foi capaz de produzir importante efeito citotóxico sobre as células de melanoma humano

SK-MEL 147 revelado pelos resultados obtidos na curva de proliferação, viabilidade celular, redução de MTT, LDH e morfologia celular, enquanto não observamos efeito citotóxico sobre os queratinócitos humanos normais HaCaT nas mesmas concentrações utilizadas para as células SK-MEL 147, sugerindo que a atividade citotóxica do OECL é dependente de processos celulares, conferindo a mesma certa seletividade.

Koffi e colaboradores (2009)⁽³³⁾ demonstraram que para células HaCaT o OECL apresenta efeito citotóxico em 24h com IC₅₀ na concentração de 150µl de extrato/ml, o que concorda com a ausência de toxicidade observada em nosso trabalho, uma vez que a maior concentração testada foi de 1µl de extrato/ml. Koffi e colaboradores (2009)⁽³³⁾ também testaram isoladamente o geranial, o neral e o geraniol, e observaram que o geranial e o neral apresentam efeito citotóxico dose-dependente, enquanto o geraniol favorece a proliferação celular também de maneira dose-dependente. Para as células SK-MEL 147 não há relatos prévios de citotoxicidade induzida pelo OECL.

Chaouki *et al.* (2009)⁽³⁴⁾ testaram o citral em células de câncer de mama humano MCF-7, nas quais observaram um IC₅₀-24h: 2,66µM, atraso no ciclo celular na fase G2/M (20µM) e indução de apoptose e necrose. Das doses testadas, 1,2 e 5µM, apenas a dose de 5µM foi capaz de promover lise celular observada pelo teste de LDH, o que condiz com os nossos resultados de relação de dose-dependência dos efeitos o OECL sobre as células SK-MEL 147.

Dudai *et al.* (2005)⁽³⁵⁾ estudando células de linhagem hematopoiética observaram que o citral é capaz de induzir apoptose através da ativação de caspase-3. Para as células SK-MEL 147 observamos indução de padrão morfológico apoptótico para as concentrações 0,05, 0,1 e 0,25µl de extrato/ml, sugerindo que o processo de ativação de caspase-3 também está ocorrendo neste tipo celular. Porém observamos que o limiar entre indução de apoptose e necrose para o OECL sobre as células SK-MEL 147 é bastante tênue, este comportamento pode ser explicado por Brohem e colaboradores (2009)⁽³⁶⁾, que ao avaliarem a indução de apoptose pelo composto 4-nerolidilcatecol em células de melanoma, verificaram que as células SK-MEL 147 são as mais capazes de sofrer vacuolização citoplasmática, perderem integridade de membrana e entrarem mais em necrose do que em apoptose, quando comparadas com outros tipos celulares de melanoma.

O OECL utilizado no presente trabalho também apresentou presença de β-mirceno. Há poucos relatos sobre atividade deste composto *in vitro*. Kauderer e colaboradores (1991)⁽³⁷⁾ relataram que o β-mirceno não apresenta atividade citotóxica ou genotóxica sobre células V79 (fibroblastos de hamster chinês), mesmo em concentrações altas de 1.000 µg/ml (limite de solubilidade).

Em nosso trabalho observamos que as concentrações 0,5 e 1µl de extrato/ml foram capazes de induzir vacuolização citoplasmática relacionada ao processo de autofagia nas células SK-MEL 147. A autofagia é um mecanismo de degradação celular coordenada por genes específicos e está associada: a) processos de reciclagem de constituintes de células eucarióticas; b) remoção de organelas danificadas, ou que precisam ser removidas para diferenciação do tecido. O processo de autofagia é dependente da proteína TOR e dependente também das proteínas relacionadas à autofagia (ATGs). A autofagia, embora seja um processo fisiológico, pode ser induzida por substâncias químicas, onde observamos a formação de vacúolos autofágicos no citoplasma, sendo também observado inchaço nas mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi⁽³⁸⁾. Para o capim-limão, ou seus componentes, não há relatos prévios de indução de autofagia, sendo este o primeiro trabalho a relatar tal fenômeno.

Em comparação com as células HaCaT, as células SK-MEL 147 apresentam ausência de mutação na proteína p53⁽³⁹⁾ e são mutantes heterozigotas para o gene NRAS⁽⁴⁰⁾. A presença de mutação (heterozigose) da p53 nas células HaCaT⁽⁴¹⁾ pode estar relacionada com a maior resistência ao OECL observada em nosso trabalho, uma vez que a proteína p53, além de ser induzível pela exposição ao citral, também é chave importante nos mecanismos de atraso de ciclo celular e indução da apoptose^(42, 43, 44, 45, 46, 47,48, 49).

CONCLUSÃO

O OECL apresentou um efeito citotóxico contra células de melanoma humano SK-MEL 147. Assim, novas pesquisas devem ser realizadas para elucidar mecanismos e compostos químicos responsáveis por este efeito. De qualquer forma, os resultados observados no presente trabalho demonstram que o capim-limão é uma fonte promissora de substâncias que poderão ser utilizadas na prevenção e/ou tratamento do melanoma humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Negrelle, R.R.B.; Gomes, E.C. *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf: chemical composition and biological activities. Rev Bras Pl Med. 9: 80–92, 2007.
2. Ganjewala, D.; Luthra, R. Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*. Nat. Prod. Commun.5:163–172, 2010.
3. Rabbani, S.I.; Devi, K.; Khanam, S.; Zahra, N. Citral, a component of lemongrass oil inhibits the clastogenic effect of nickel chloride in mouse micronucleus test system. Pak. J. Pharm. Sci. 19:108–113, 2006.
4. Marongiu, B.; Piras, A.; Porcedda, S.; Tuveri, E. Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. Nat. Prod. Res., 20:455-459, 2006.
5. Schaneberg, B.T.; Khan, I.A. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. J Agric Food Chem.50:1345-1349, 2002.
6. Barbosa, L.C.A.; Pereira, U.A.; Martinazzo, A.P.; Maltha, C.R.A.; Teixeira, R.R.; Melo, E.C. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf samples. Molecules.13:1864-1874, 2008.
7. Cheel, J.; Theoduloz, C.; Rodríguez, J.; Schmeda-Hirschmann, G. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). J. Agric. Food Chem, 53:2511–2517, 2005.
8. Suaeyun, R.; Kinouchi, T.; Arimochi, H.; Vinitketkumnuem, 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*.18:949–955, 1997.

9. Choi, H-S.; Song, H.S.; Ukeda, H.; Sawamura, M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*;48:4156–4161, 2000.

10. Melo, S.F.; Soares, S.F.; Da Costa, R.F.; Da Silva, C.R.; De Oliveira, M.B.; Bezerra, R.J.; Caldeira-de-Araujo, A.; Bernardo-Filho, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 496:33–38, 2001.

11. Puatanachokchai, R.; Kishida, H.; Denda, A.; Murata, N.; Konishi, Y.; Vinitketkumnuen, U.; Nakae, 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 Lett.*;183:9–15, 2002.

12. Tapia, A.; Cheel, J.; Theoduloz, C.; Rodríguez, J.; Schmeda-Hirschmann, G.; Gerth, A.; Wilken, D.; Jordan, M.; Jimenez-Gonzalez, E.; Gomez-Kosky, R.; Mendoza, E.Q. Free radical scavengers from *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF plants cultivated in bioreactors by the temporary immersion (TIS) principle. *Z. Naturforsch [C]*.;62: 447–457, 2007.

13. Pereira, R.P.; Fachinetto, R.; Prestes, A.S.; Puntel, R.L.; Silva, G.N.S.; Heinzmann, B.M.; Boschetti, T.K.; Athayde, M.L.; Burger, M.E.; Morel, A.F.; Morsch, V.M.; Rocha, J.B. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res.*;34: 973–983, 2009.

14. Mitić-Ćulafić, C.; Žegura, B.; Nikolić, B.; Vuković-Gačić, B.; Knežević-Vukčević, J.; Filipič, M. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chem. Toxicol.* ;47: 260–266, 2009.

15. Bidinotto, L.T.; Costa, C.A.R.A.; Salvadori, D.M.F.; Costa, M.; Rodrigues, M.A.M.; BARBISAN, L.F. Protective effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus* STAPF) essential oil on DNA damage and carcinogenesis in female Balb/C mice. *J. App. Toxicol.*, 31: 536-544, 2010.

16. Instituto Nacional do Câncer. **Estatísticas do Câncer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 21 abr. 2013.

17. Garcia, A.M.G.; McLaren, C.E.; Meyskens, F.L. Jr. Melanoma: is hair the root of the problem? *Pigment cell melanoma Res*, 24: 110-118, 2011.

18. Paek, S.C.; Sober, A.J.; Tsao, H.; Mihm, M.C. JR.; Johnson, T.M. Cutaneous Melanoma. In: Wolff, K.; Goldsmith, L. A.; Katz, S. I.; Gilchrest, B. A.; Paller, A. S.; Leffell, D. J (Eds). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. New-York: *McGraw-Hill*, 7: 1134-1157, 2008.

19. Miller, A.J.; Mihm, M.C. JR. Mechanism of disease: Melanoma. *New Eng J Med*, 355: 51-65, 2006.
20. Kanavy, H.E.; Gerstenblith, M.R. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 30:222-228, 2011.
21. Lyons N.M.; O'Brien, N.M. Modulatory effects of an algal extract containing Astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. *J Dermatol Sci.*;30: 73-84, 2002.
22. Sander, C.S. *et al.* Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int. J. Dermat.*, 43: 326-335, 2004.
23. Afaq, F.; Adhami, V.M.; Ahmad, N.; Mukhtar, H. Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Front. Biosci.*, 7: 784-792, 2002.
24. Stoner G.D.; Morse, M.A.; Kelloff, G.J. Perspectives in cancer chemoprevention. *Environ. Health Perspect.*;105: 945-954, 1997.
25. De Flora, S.; Ferguson, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.*; 591: 8-15, 2005.
26. Francis, S.O.; Mahlberg, M.J.; Johnson, K.R.; Ming, M.; Dellavalle, R.P. Melanoma chemoprevention. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 55:849-861, 2006.
27. Ghiselli, A. *et al.* A Fluorescence-based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant capability. *Free Radical Biology & Medicine*, 18: 29-36, 1995.
28. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods*, 65:55-63, 1983.
29. Tsuboy, M.S.F. *et al.* Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp Toxicol Pathol*, in press, 2010.
30. Pezzuto, J.M. Plan-derived anticâncer agentes. *Biochem. Pharmacol.*, 53: 121-133, 1997.
31. Rauber, C.S., Guterres, S.S., Schapoval, E.E.S. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37: 597-601, 2005.
32. Wang, X.D., Krinsky, N.I., Tang, G.W., Russell, R.M. Retinoic acid can be produced from excentric cleavage of beta-carotene in human intestinal mucosa. *Arch. Biochem. Biophysics*, 293: 298-304, 1992.
33. Koffi, K., Komla, S., Catherine, G., Cristine, R., Jean-Pierre, C., Laurence, N. In vitro activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essencial oils from Togo. *Bangladesh J. Pharmacol.*, 4:29-34, 2009.

34. Chaouki, W., Leger, D.Y., Liagre, B., Beneytout, J-L., Hmamouchi, M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cell., *Fund. Clin. Pharmacol.*, 23:549-556, 2009.
35. Dudai, N.; Weinstein, Y.; Krup, M.; Rabinski, T.; Ofir, R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med.*;71: 484-488, 2005.
36. Brohem, C.A, Sawada, T.C.H., Massaro, R.R., Almeida, R.L., Rivelli, D.P. Ropke, C.P., Da Silva, V.V., De Lima, T.M., Curi, R., Barros, S.B.M, Maria-Engler, S.S. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicol. in vitro*, 23:111-119, 2009.
37. Kauderer, B.; Zamith, H.; Paumgarten, F.J.; Speit, G. Evaluation of the mutagenicity of betamyrcene in mammalian cells *in vitro*. *Environ Mol Mutagen.*;18:28-34, 1991.
38. Mariño, G., López-Otín. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell. Mol. Life*, 61:1439-1454, 2004.
39. Bertrand, Y.; Demeule, M.; Michaud-Levesque, J.; Béliveau, R. Melanotransferrin induces human melanoma SK-Mel-28 cell invasion *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353: 418–423, 2007.
40. Dicker, A.P.; Volkenandt, M.; Albino, A.P. Mutational analysis of human NRAS genes in malignant melanoma: Rapid methods for oligonucleotide hybridization and manual and automated direct sequencing of products generated by the polymerase chain reaction. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1: 257-269, 1990.
41. Lehman, T.A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Harris, C.C. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis*, 14:833-839, 1993.
42. Duerksen-Hughes, P.J.; Yang, J.; Ozcan, O. P53 induction as a genotoxic test for twenty-five chemicals undergoing *in vivo* carcinogenicity testing. *Environ Health Perspect.*;107: 805-812, 1999.
43. Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*; 51: 6304-6311, 1991.
44. Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., Kastan, M.B. Wildtype p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7491-7495, 1992.
45. Ginsberg, D., Michael-Michalovitz, D., Ginsberg, D., Oren, M. Induction of growth arrest by a temperature sensitive p53 mutant is correlated with increased nuclear localization and decreased stability of the protein. *Mol Cell Biol.*; 11:582-585, 1991.
46. Yonish-rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., Oren, M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature.*; 352:345-347, 1991.

47. Yonish-rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J., May, P., Orem, M. p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol* ., 13: 1415-1423, 1993.
48. Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., Wyllie, A.H. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362:849-852, 1993.
49. Ryan, J.J., Danish, R., Gottlieb, C.A., Clarke, M.F. Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* .; 13: 711-719, 1993.