

IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Gallesia integrifolia* EM MACRÓFAGOS J774A.1

Antonio Henrique Rosas Novaes (PIBIC/FA/Uem), Bruna Gomes Sydor (PCS/Uem), Fabiana Borges Padilha Ferreira (PCS/Uem), Zilda Cristiani Gazim (Unipar/Umuarama/Pr), Maria Valdrinez Campana Lonardoni (Orientador), e-mail: mvclonardoni@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde,
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, PR.

Farmácia 40300005 e Farmacognosia 40302008

Palavras-chave: Fitoterapia, Phytolaccaceae, Plantas medicinais

Resumo

Plantas medicinais podem ser definidas como espécies vegetais com potencial terapêutico e farmacológico. Entre essas espécies temos a *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms, pertencente à família Phytolaccaceae. Os extratos provenientes dessa árvore nativa brasileira se mostraram eficazes em estudos prévios que avaliaram seu potencial antibacteriano, antifúngico, antiúlcera gástrica, antiviral, anti-inflamatório e antinociceptivo. Culturas celulares vêm servindo como um valioso recurso para experimentações, fornecendo respostas mais simplificadas e evitando o uso de animais nas pesquisas. Neste estudo avaliamos a constituição química dos óleos essenciais da *Gallesia integrifolia*, os quais revelaram 16 compostos presentes no óleo essencial (OE) da folha, 7 compostos no OE do fruto e 8 compostos no OE da flor, onde o mais abundante nas três porções da planta foi o bis(2-sulfidríleto)-dissulfeto. Também foi possível notar que os compostos encontrados são formados predominantemente por enxofre. Para verificar o potencial citotóxico em células fagocitárias, utilizamos macrófagos da linhagem J774.A1. Os resultados obtidos mostraram que não houve citotoxicidade. Estudos futuros serão realizados para avaliar a atividade do óleo essencial de *G. integrifolia* em formas amastigotas de *Leishmania*.

Introdução

Plantas medicinais podem ser definidas como espécies vegetais com potencial terapêutico, capazes de gerar algum efeito farmacológico em benefício humano ou animal. O homem primitivo usava desses recursos para restabelecimento de sua saúde.^[1]

A família Phytolaccaceae inclui plantas com propriedades terapêuticas contra inflamações, cânceres, reumatismos, doenças respiratórias, dermatites, entre outras.^[2] *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms, pertencente

à essa família, é uma árvore de grande porte, nativa do Brasil, conhecida popularmente como pau-d'álho. Extratos provenientes de *G. integrifolia* já mostraram efeito antibacteriano, antifúngico, efeito antiúlcera gástrica, antiviral, anti-inflamatório e antinociceptivo.^[3]

A cultura de células é um recurso valioso para a pesquisa experimental, servindo como um modelo biológico que evita o uso de animais e fornecendo respostas mais simplificadas para problemas complexos. Além disso, dados produzidos por culturas de células *in vitro* são suficientemente informativos, principalmente para análise de possíveis alvos farmacológicos.^[4] Macrófagos são exemplos de células utilizadas em experimentação, e possuem grande importância no sistema imunológico, sendo fundamentais na imunidade inata e no condicionamento da resposta imune adaptativa. Entre suas principais funções está a fagocitose de partículas estranhas ao hospedeiro e a apresentação de antígenos.^[5]

O objetivo deste trabalho é aprofundar o conhecimento acerca do óleo essencial de *G. integrifolia* avaliando quimicamente seus componentes e verificando se apresenta citotoxicidade sobre macrófagos J774A.1.

Materiais e métodos

Obtenção do óleo essencial de *G. integrifolia*: os frutos, folhas e flores de *G. integrifolia* foram coletados na cidade de Umuarama-PR e o modo de extração do óleo essencial foi a hidrodestilação. O óleo resultante foi alíquotado e armazenado em frascos âmbar a -20°C. Os experimentos foram realizados com o óleo em temperatura ambiente.

Composição química do óleo essencial de *G. integrifolia*: as três porções do óleo (50 µL cada) foram separadamente diluídas com 1000 µL de diclorometano e a análise química foi feita por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro (CG-EM) Agilent Technologies 5977A MSD/7890B GC System, e o programa para identificação dos compostos foi o Agilent MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis, usando n-alcenos como padrões.

Cultura e manutenção de macrófagos J774A.1: macrófagos murinos da linhagem J774A.1 foram cultivados em meio RPMI 1640 (Gibco, New York, NY, EUA) pH 7,6, suplementado com 20% de soro bovino fetal, bicarbonato de sódio e antibióticos. As células foram mantidas em estufa 37°C com 5% de CO₂ e submetidas a manutenções por repiques semanais.

Avaliação da atividade citotóxica em macrófagos J774A.1: com intuito de avaliar a atividade citotóxica do óleo, foi utilizada a técnica de redução de sais de tetrazólio (XTT). Macrófagos J774A.1 foram transferidos para uma placa de cultura de 96 poços (TPP™ test plate, Switzerland), com suspensão celular de 5 x 10⁵ macrófagos/mL. A placa foi incubada por 48 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após lavagens com meio RPMI 1640, os macrófagos aderidos foram tratados com o óleo essencial dos frutos, folhas ou flores de *G. integrifolia* nas concentrações de 0,5 a 0,000244 mg/mL, diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido) 4%, e incubados por 24 horas. Para o

controle de viabilidade, foram utilizadas culturas sem tratamento. A cada poço foi adicionado 100 µL da solução XTT e a placa incubada por 4 horas a 37°C, com 5% de CO₂. Os resultados foram mensurados em espectrofotômetro (Leitora de microplacas Locus – LMR 96) a 450/630 nm.

Resultados e Discussão

Os resultados da identificação química realizada por CG-EM permitiu a identificação os compostos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química do OE de *Gallesia integrifolia* analisado por CG-EM

Componentes	Folha (%)	IRcal (Fo)	Fruto (%)	IRcal (Fr)	Flor (%)	IRcal (Fl)
Dissulfeto de dimetila	19,24	*	-	*	0,37	-
(E)-2-Hexenal	21,32	*	-	-	-	-
Trissulfeto de dimetila	1,10	773	0,4	774	-	-
Metil ditio-metano	6,41	932	14,67	834	11,4	836
1-metil tio-heptano	0,41	937	-	-	-	-
Tris(metil) tio-metano	2,06	1164	3,76	864	-	-
6-Etil-2,3-dimetil-tetrahydro-tiopiran-4-ol	0,48	1277	-	-	-	-
Bis(2-sulfidrietil)-dissulfeto	39,28	1335	70,41	1036	69,97	1041
Metoxycarbonil metoxitioxometil dissulfeto	0,12	1355	0,31	1055	-	-
Dietil ftalato	0,20	1397	-	-	-	-
7,7-Dimetil-2-oxo-1,8-dioxaspiro[4.5]decano-4-carboxamida	0,15	1430	-	-	-	-
1-Hexil-6-hidroxi-4-metilhexahidropirimidina-2-tiona	0,22	1452	-	-	-	-
l-Gala-l-idol-octose	0,17	1515	-	-	-	-
1-Cloro-2-(2-clorovinildisulfanilmetildisulfanil)eteno	6,06	1575	8,37	1274	12,82	1279
d-Glicero-d-guloheptose dimetilmercaptal	0,99	1651	-	-	1,23	1211
Fitol	1,79	1915	-	-	-	-
2-O-benzoil-1-metiltio-α-d-Glicose	-	-	2,08	1210	0,74	1215
Tetrassulfeto de dimetila	-	-	-	-	3,47	866

OE: óleo essencial; %: relativa da área de cada pico; IRcal: índice de retenção calculado com base em uma série de n-alcanos homólogos C7–C40; Fo: óleo essencial da folha; Fr: óleo essencial do fruto; Fl: óleo essencial da flor; *: não calculado; -: não aplicável

A análise química dos componentes do óleo essencial das três porções de *G. integrifolia* indicaram a presença de 16 compostos no óleo essencial da folha, 7 compostos no óleo essencial do fruto e 8 compostos no óleo essencial da flor, sendo bis(2-sulfidrietil)-dissulfeto encontrado em maior quantidade nas três porções (39,28%, 70,41% e 69,97%, respectivamente). Houve predomínio de compostos de enxofre, os quais são conhecidos por protegerem a planta contra patógenos e pragas. Com a avaliação da citotoxicidade do óleo em macrófagos J774A.1 pelo método de XTT foi possível observar que os óleos essenciais das folhas frutos e flores de *G. integrifolia* não foram citotóxicas nas concentrações utilizadas, portanto a CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) não foi alcançada.

Conclusões

Os óleos essenciais das folhas, frutos e flores de *G. integrifolia* apresentaram um predomínio de compostos enxofre em sua constituição química, os quais são extremamente importantes na defesa da planta contra patógenos. Esses estudos podem servir como base para pesquisas futuras sobre a atividade destes óleos sobre formas amastigotas de leishmanias, uma vez que é em macrófagos de seus hospedeiros que estes parasitos se multiplicam. As concentrações do óleo utilizadas não foram capazes de atingir a CC₅₀, não apresentando atividade citotóxica nas células, portanto o óleo da *G. integrifolia* não apresenta grande interferência nessas células fagocitárias. Porém, futuramente novos testes serão realizados com outras concentrações a fim de verificar se, em menores concentrações, a CC₅₀ será atingida.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa, aos professores do Laboratório de Imunologia Clínica, principalmente a prof^a Maria Valdrinez pela oportunidade para realização do projeto. À todos do laboratório, especialmente a Bruna Sydor por todo o suporte e ensinamentos desde o início do projeto.

Referências

- [1] ALMEIDA, MZ. Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. In: Plantas Medicinais. [online]. 3rd ed. Salvador: EDUFBA, 2011
- [2] MA, Xiao-Pan *et al.* Novel flavones from the root of *Phytolacca acinosa* Roxb. 10.1002/cbdv.201700361, 2017
- [3] DE JESUS SILVA JÚNIOR, A. de J.; CAMPOS-BUZZI, F.; ROMANOS, M.T.V.; WAGNER, T.M.; GUIMARÃES, A.F. de P.C.; FILHO, V.C.; BATISTA, R. Chemical composition and antinociceptive, anti-inflammatory and antiviral activities of *Gallesia gorazema* (Phytolaccaceae),
- [4] FRESHNEY, R. I. Basic Principles of Cell Culture, in Culture of Cells for Tissue Engineering (eds G. Vunjak-Novakovic and R. I. Freshney), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi:10.1002/0471741817.ch1, 2006.
- [5] ABBAS, Abul K. Imunologia Celular e Molecular. 8. ed. rev. [S. l.: s. n.], 2015.