

ESTUDO DO EFEITO CITOTÓXICO DE EXTRATOS ORGÂNICOS DA CATANDUVA FRENTE A LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

Danielle Feijó de Moura¹; Tamiris Alves Rocha; Dayane de Melo Barros; Silvio Assis de Oliveira Ferreira; Márcia Vanusa da Silva

1- Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, danielle.feijo@hotmail.com

Resumo: O câncer é uma doença caracterizada pelo aumento descontrolado da proliferação celular, em geral ocorre paralelamente ao aumento do crescimento e perda da diferenciação da célula. Assim as células cancerígenas perdem suas características originais de diferenciação e se tornam atípicas. A grande incidência de câncer tem despertado uma necessidade de se encontrar novos agentes quimioterápicos que sejam mais eficientes no tratamento dessa doença. O Brasil é considerado o país mais rico em biodiversidade, e o bioma caatinga apesar de ser pouco explorado, tem demonstrado um potencial biológico muito significativo no que diz respeito a compostos com atividades biológicas promissoras. O presente trabalho investigou a ação citotóxica dos extratos orgânicos da Catanduva, em células de linhagens tumorais humanas. Os extratos da Catanduva foram obtidos em extrator automático seguindo a série eluotrópica de solventes (hexano, acetato de etila e metanol). As linhagens de células utilizadas foram HEp-2 (carcinoma de laringe humana) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano) mantidas em meio de cultura DMEM e MCF-7 (câncer de mama humano) e HI-60 (leucemia promielocítica aguda) mantidas em meio de cultura RPMI 1640. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (-3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazol). Os extratos foram testados com concentração final de 50µg/mL. Os extratos orgânicos na concentração de 50µg/mL, não apresentaram citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais testadas. Estudos adicionais com linhagens diferentes deverão ser realizados a fim de se, obter mais informações acerca do potencial citotóxico desta planta.

Palavras-chave: Biodiversidade. Câncer. Proliferação Celular. Quimioterápicos. Tratamento.

Introdução

A *Pityrocarpa moniliformis*, conhecida popularmente como Catanduva, é uma espécie nativa do Nordeste Brasileiro, sendo encontrada exclusivamente no bioma caatinga (LORENZI, 2002; AZÊREDO, 2009). Pertencente à família Fabaceae, é considerada a terceira maior família de Angiospermas depois da Asteraceae e Orchidaceae; compreendendo aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies (SOUSA et al., 2009). Na caatinga esta família é representada por sete espécies que incluem árvores apícolas e melitófilas muito comuns em região de clima semiárido. Esta família é particularmente rica em flavonoides e compostos biossinteticamente relacionados, como rotenóides e isoflavonoides. Além disso, alcalóides, terpenóides e esteróides são exemplos de outras classes de substâncias que ocorrem em muitos exemplares dessa família (ROCHA e SILVA et al., 2007). Esses compostos químicos são conhecidos por apresentarem uma série de propriedades farmacológicas que lhes permite atuar em sistemas

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

biológicos e assim favorecer a saúde humana (PETERSON et al.,1998).

A seleção de uma espécie pertencente a este gênero para o desenvolvimento do presente estudo, justifica-se pelo fato dos fitoquímicos serem pouco explorados quanto a sua composição e potenciais propriedades biológicas.

No âmbito de pesquisas frente a descoberta de fármacos anticancerígenos, uma relevante ferramenta utilizada são os testes *in vitro* com base em cultura de células tumorais, os quais buscam novas moléculas que evitem o crescimento destas células.

Um dos ensaios citotóxicos *in vitro* mais utilizados é baseado no teste colorimétrico com o sal de tetrazólio MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], este ensaio avalia a viabilidade celular, de modo que é efetuado sua leitura em espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços, caracterizando-se como um protocolo versátil e quantitativo (MOSMAN, 1983). O ensaio de MTT avalia a atividade oxidativa mitocondrial, ou seja, o sal é reduzido nas mitocôndrias das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura, estes cristais são extraídos através da adição de um solvente apropriado. A variável resultante da quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

De acordo com Moser (2011), este ensaio é de caráter rápido, seguro e com alto grau de precisão quando comparado a outros métodos colorimétricos ou outras técnicas como as radioativas (ensaio que consiste na capacidade das células de incorporar substâncias radioativas ou na capacidade liberar um marcador radioativo).

Embora haja uma grande quantidade de tratamentos e agentes anticancerígenos, a maioria deles exibe uma estreita atividade terapêutica devido à falta de seletividade contra as células cancerígenas, acarretando em vários efeitos colaterais. Sendo assim, faz-se necessária a realização de pesquisas tendo em vista, o desenvolvimento de tratamentos e drogas seletivas que possam eliminar as células tumorais malignas ou torná-las benignas sem afetar as células normais (KHAZIR et al. 2014).

As plantas medicinais têm se tornado uma alternativa para a descoberta de substâncias com potencial efeito antineoplásico, e para isso são propostos modelos de screening de citotoxicidade, pois, estes permitem a obtenção de dados preliminares para estudos posteriores, expandindo cada vez mais a área de pesquisa (ITHARAT et al., 2004). O estudo fitoquímico tem a finalidade de identificar a composição química das plantas ou conhecer o grupo de metabólitos secundários relevantes nas mesmas (CARDOSO, 2004).

Vários estudos têm relatado a atividade citotóxica de extratos obtidos de diferentes espécies vegetais, Suffredini et al. (2007a) por exemplo, realizou uma triagem de extratos com atividade antitumoral nas seguintes linhagens celulares: pulmão, NCI-H460, adenocarcinoma de cólon KM-12, câncer do sistema nervoso central SF-268 e leucemia RPMI-8226. Neste trabalho foram testados 1220 extratos, de 351 espécies pertencentes a 74 famílias, coletadas entre 1997 e 2001. Do total de extratos analisados, 9 mostraram atividade frente as células de câncer de pulmão, 29 de cólon, 14 do sistema nervoso central e 24 de leucemia.

Outro estudo também relatou a importância da introdução de novas drogas para o tratamento de câncer de mama, neste, foram testados extratos obtidos de espécies da Amazônia e da Mata Atlântica, na linhagem celular MCF-7, demonstrando atividade citotóxica em 11 extratos testados, o que equivale a 0,9% do total analisado (SUFFREDINI et al., 2007b).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de extratos das folhas de *Pityrocarpa moniliformis* frente a linhagens de células tumorais de: HEp-2 (carcinoma de laringe humana), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), MCF-7 (câncer de mama humano) e HI-60 (leucemia promielocítica aguda).

Metodologia

As partes aéreas da Catanduva foram coletadas no Parque Nacional do Catimbáú, em Buíque, Pernambuco. Suas folhas foram levadas à estufa de circulação de ar forçado (40-45°C) por um período de três a quatro dias. A espécie também foi identificada conforme as técnicas taxonômicas habituais e depositada no Herbário do IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco). O material vegetal foi processado em moinho de bancada e submetido à extração em aparelho de Soxhlet seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: hexano, acetato de etila e metanol. O líquido obtido foi rotaevaporado e deixado em temperatura ambiente para secagem completa do solvente. Todos os extratos obtidos foram armazenados a -20°C para análises adicionais.

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983). As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram HEp-2 (carcinoma de laringe humana) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), mantidas em meio de cultura DMEM, MCF-7 (câncer de mama humano)

e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) mantidas em meio de cultura RPMI 1640. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

As células MCF-7, HEp-2, NCI-H292 (10⁵ células/mL) e HL-60 (3 x 10⁵ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24h. Em seguida os extratos orgânicos foram dissolvidas em DMSO (1%) e adicionados aos poços em concentração final de 50µg/mL. O fármaco doxorrubicina (5µg/mL) foi utilizado como padrão. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25µL de MTT (5mg/mL) e depois de 3h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 7.0.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas, sendo: amostras com atividade (95 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50 %) conforme RODRIGUES et al. (2014).

Resultados e Discussão

Mediante a análise das médias das absorbâncias em comparação com o controle negativo no ensaio do MTT, na concentração final de 50µg/mL, não foi observada citotoxicidade nos extratos orgânicos (Hexânico, Acetato de etila e Metanol), testados frente às linhagens de células tumorais, sem diferença estatística entre as amostras e o controle negativo (DMSO a 1%). O extrato de acetato de etila apresentou os maiores valores de inibição celular para as células HL-60, MCF-7 e Hep-2 (41,7%, 39,1% e 20,9%, respectivamente), seguido do extrato metanólico que obteve inibição de 28,3% para NCI-H292 e 22,2% para HL-60. O controle positivo, Doxorrubicina, apresentou maior inibição celular na concentração final de 5µg/mL para a linhagem celular HL-60 (97,50%), seguido da MCF-7, NCI-H292 e Hep-2 (73,2%, 70,1% e 52,6%, respectivamente).

Tabela 1. Porcentagem de inibição celular dos extratos orgânicos da Catanduva frente á diferentes linhagens de células tumorais.

% de INIBIÇÃO CELULAR								
Produtos teste	Hep-2	EPM	NCI-H292	EPM	MCF-7	EPM	HL-60	EPM
Extrato hexânico	9,7	0,51	6,9	0,23	15,7	0,9	11,2	0,23
Extrato Metanólico	15,4	1,7	28,3	0,81	10,7	0,8	22,2	1,0
Extrato Acetato de etila	20,9	0,76	8,52	0,17	39,1	0,7	41,7	1,8
Doxorrubicina	52,6	1,2	70,1	0,5	73,2	0,6	81,3	0,9

EPM = Erro Padrão Médio.

Apesar da ausência de citotoxicidade dos extratos orgânicos testados frente a essas linhagens de células tumorais, estudos realizados com a Catanduva têm revelado várias atividades farmacológicas devido ao fato de sua composição apresentar substâncias químicas funcionais como: flavonoides, saponinas, triterpenos e taninos gálicos (DA SILVA et al., 2013). Os flavonoides, classificados como polifenóis, despertaram grande interesse dos pesquisadores por ter sido comprovado que essas moléculas são responsáveis pela prevenção do câncer devido a diversos mecanismos bioquímicos, os quais atuam na supressão de carcinogênese *in vitro* e em modelo animal (RAMOS, 2007). Outros trabalhos, também têm relatado que alguns triterpenos possuem propriedades anticancerígenas sobre distintas linhagens tumorais (GALLO; SARACHINE, 2009). Moriarity et al. (1998) observaram que uma classe de triterpeno desempenhou ação citotóxica sobre células de carcinoma hepatocelular humano Hep-G2, assim como também em células cancerígenas epidermóides humanas A-431 e em células H4IIE de hepatocarcinoma de rato.

Para que determinado material seja considerado citotóxico, é necessário que ele libere um elemento ou composto químico em quantidade suficiente para causar a morte celular. E A morte celular é causada pela inibição das vias metabólicas. O número de células afetadas indica a dose e a potência da substância analisada capaz de suprimir as células. O conceito de dose liberada do composto tóxico é considerado equivalente a dose absorvida pelas células (REUTER, 2008).

O ensaio de MTT é então utilizado para determinar a viabilidade celular, avaliando a capacidade de inibir o desenvolvimento de células tumorais, mediante verificação da atividade de uma enzima mitocondrial - a succinato desidrogenase. É quantificado o quanto de MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADPH formando cristais de formazan, de cor azul, indicando assim a presença ou não de atividade mitocondrial nas células (apenas células viáveis metabolizam este sal). Dessa maneira a quantidade de formazan medida por espectrofotometria é diretamente proporcional ao número de células viáveis (REUTER, 2008).

Apesar dos dados obtidos indicarem que na concentração de 50µg/mL, os extratos orgânicos não demonstraram citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais testadas, são necessários testes adicionais com outras linhagens de células tumorais, a fim de elucidar de forma mais clara o possível comportamento não citotóxico da Catanduva agregando maior valor a esta espécie vegetal, que revela-se com promissor potencial terapêutico.

Conclusões

Os extratos orgânicos da Catanduva não apresentaram atividade citotóxica tanto *in vitro* na concentração de 50µg/ml, quanto frente às linhagens de células tumorais pelo método do MTT. Sendo assim, este estudo gerou resultados que contribuem para melhor um conhecimento e compreensão da utilização popular desta planta. Contudo, observa-se a necessidade de estudos complementares para melhor elucidar e agregar maior valor a espécie, uma vez que esta possui algumas atividades biológicas referenciadas, tornando-a uma planta com possível potencial terapêutico.

Agradecimentos

Os autores expressam agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco- FACEPE pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

Referências

ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A. HURSEY, M.L.; CZERWINSKI, M.J.; FINE, D.L.; ABBOTT, B.J.; MAYO, J.G.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R. Feasibility

of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.

CARDOSO, I. N. Plantas tóxicas no perímetro urbano de Caxias, Maranhão. **Monografia (Especialização em Educação Ambiental)**, CESC-UEMA, 2004.

DA SILVA, M. F. S. Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antibacteriana de *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH) LUCKON & R. W. JOBSON (Fabaceae), Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido), Universidade Federal do Vale do São Francisco, **Mestrado em Recursos Naturais Do Semiárido**, Petrolina-Pe. 147p. 2013.

GALLO, M.; SARACHINE, M. Biological activities of Lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, 2009.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.; AMOOQUAYE, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.1, p.33-39, 2004.

KHAZIR, J.; MIR, B. A.; PILCHER, L.; RILEY, D. L. Role of plants in anticâncer drug Discovery. **Phytochemistry**, v.7, p.173-181, 2014.

MORIARITY, DM.; HUANG, J.; YANCEY, CA.; ZHANG, P.; SETZER, WN.; LAWTON, RO.; BATES, RB.; CALDERA, S. Lupeol is the cytotoxic principle in the leaf extract of *Dendropanax cf. querceti*. **Planta médica**, v.64, p.370-372, 1998.

MOSER, C. Avaliação ecotoxicológica do Manancial da Lagoa do Peri: testes genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos. 2011. 125 p. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

PETERSON, J.D. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, p.1995 -2018, 1998.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to câncer chemoprevention. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.18 p.427-42. 2007.

REUTER, S.; EIFES, S.; DICATO, M.; AGGARWAL, B.B.; DIEDERICH, M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochemistry Pharmacology**, v. 76 p.1340-51. 2008.

ROCHA e SILVA, H.; DA SILVA, C. C. M.; CALAND-NETO, L.B.; LOPES, J. A. D.; CITÓ, A. M. G. L. E CHAVES, M. H. "Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol". **Quím. Nova**, v.30, v.8, p.1877-1881, 2007.

RODRIGUES, F. A. R.; BOMFIM, I.S.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C.; GONÇANVES, R.S.B.; WARDELL, J.L.; WARDELL, S.M.S.V.; SOUZA, M.V.N. Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 83, p. 126-131, 2014.

SOUSA, J.S.; BASTOS, M.N.C.; ROCHA, A.E.S. Mimosoideae (Leguminosae) do litoral paraense. **Acta Amazonica**, v.39, p.799-812, 2009.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; FRANA, S.A.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v.62, p.789-800, 2007b.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v.78, n.3, p.223-226, 2007a.