

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS DE EXTRATO DAS FOLHAS DE *Esenbeckia pumila* Pohl.**

**Danielly de S. e Silva<sup>1\*</sup>(IC), Geane Karla G. F. Duarte<sup>1</sup>(PG), Renato G. Santos<sup>1</sup>(PG), Antônio C. S. Menezes<sup>1</sup>(PQ), Manoel O. de Moraes<sup>2</sup>(PQ), Cláudia do Ó. Pessoa<sup>2</sup>(PQ), Andrea F. Moura<sup>2</sup>(PQ,PG). \* danielly.ss47@gmail.com**

<sup>1</sup>Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás (CCTE-UEG). Br 153, Nº 3105 Fazenda Barreiro do Meio, caixa postal 459, CEP: 75.132-903, Anápolis-GO.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Rua coronel Nunes de Mello, 1127, caixa postal 3157, CEP: 60.430-270, Fortaleza-CE.

Resumo: As plantas do gênero *Esenbeckia*, são encontradas em alguns biomas brasileiros, incluindo o cerrado que representa 23% da vegetação brasileira total. Alguns estudos já realizados sobre esse gênero permitiram a elucidação de alguns metabólitos secundários (alcaloides e furanocumarinas), estes são considerados marcadores químicos dessas plantas. Sabendo assim da importância das plantas desse gênero e na riqueza de conteúdo científico que estas podem oferecer, este trabalho objetivou avaliar a citotoxicidade de extratos das folhas de *Esenbeckia pumila* Pohl (RUTACEAE) frente a linhagens de células tumorais como a SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata) e HCT-116 (colon). O teste de citotoxicidade foi realizado utilizando o método de MTT, e a análise estatística foi realizada segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular, usando o programa *GraphPad Prism*. A fração diclorometânica (EPFED) mostrou-se citotóxica para duas linhagens de células, SF-295 e HCT-116 (glioblastoma e colon); enquanto as outras amostras foram consideradas não citotóxicas.

Palavras-chave: Atividade citotóxica. *Esenbeckia pumila*, plantas medicinais.

### **Introdução**

As plantas medicinais vêm sendo usadas como fonte de medicamentos no tratamento de diversas doenças (MACIEL et al., 2002). A pesquisa sobre seus metabólitos secundários contribuiu desde a antiguidade para o uso de novos produtos farmacêuticos. Nos últimos 25 anos, dos agentes anticancerígenos, por exemplo, 77,8% foram oriundos de produtos naturais (NOGUEIRA et al., 2010).

A utilização de plantas medicinais como uma fonte alternativa de medicação justifica-se pelo limitado acesso aos programas de saúde pública, retratando assim a realidade de grande parte da população brasileira (FOGLIO et al., 2006). Segundo os dados levantados a maior parte das informações sobre a utilização de plantas medicinais é proveniente da tradição familiar, seguido da opção por um tratamento

natural, além do alto custo dos medicamentos industrializados e o difícil acesso da população à assistência médica (BRASILEIRO et al., 2008).

Um exemplo de plantas medicinais são as plantas do gênero *Esenbeckia*, que são encontradas em alguns biomas brasileiros, incluindo o cerrado que representa 23% da vegetação brasileira total. Alguns estudos sobre esse gênero permitiu a elucidação de alguns metabólitos secundários (alcaloides e furanocumarinas), estes são considerados marcadores químicos dessas plantas. (BARROS FILHO et al., 2007). A ausência de estudos fitoquímicos que determinem os constituintes e suas atividades biológicas que estejam presentes nas plantas desse gênero justifica e estimula a escolha de uma espécie desse gênero como material de estudo do presente trabalho.

Um importante instrumento para o estudo de novos fármacos anticancerígenos são os testes *in vitro* utilizando-se cultura de células tumorais visando à procura de novas moléculas que inibam o crescimento destas células. Modelos de *screening* de citotoxicidade contribuem para a seleção de plantas com potencial antineoplásico fornecendo dados preliminares para trabalhos futuros ampliando ainda mais o campo de pesquisa (ITHARAT et al., 2004).

A pesquisa fitoquímica busca conhecer os constituintes químicos das plantas ou conhecer o grupo de metabólitos secundários relevantes nas mesmas (CARDOSO, 2004). O presente trabalho objetiva avaliar a citotoxicidade de extratos das folhas de *Esenbeckia pumila* Pohl (RUTACEAE) frente a linhagens de células tumorais como a SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata) e HCT-116 (colon).

## Material e Métodos

### COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO:

As folhas da planta *Esenbeckia pumila* Pohl (RUTACEAE) foram coletadas no Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas Anápolis, UEG, no mês de maio de 2015. As folhas foram lavadas com água corrente em abundância e em seguida foram secas em estufa com circulação de ar MARCONI MA – 035 a aproximadamente 50°C durante 48 horas. Depois de secas foram moídas em moinho de facas modelo MA-580.

### **OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO:**

As folhas de *Esenbeckia pumila* Pohl (RUTACEAE) passaram por sucessivas extrações a frio com solvente álcool etílico 95% P.A., e em seguida o solvente foi filtrado. O filtrado então foi seco evaporando o solvente com auxílio do rotaevaporador sob pressão reduzida, a temperatura de 25-35 °C, obtendo assim o extrato bruto etanólico (EPFE). O procedimento foi repetido até que o filtrado tornou-se translúcido.

### **FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO:**

O fracionamento do extrato bruto etanólico das folhas (EPFE) foi realizado com celulose microcristalina D para cromatografia de camada fina como fase estacionária e solventes por ordem de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

O fracionamento resultou nas frações: Fração hexânica (EPFEH); Fração diclorometano (EPFED); Fração acetato de etila (EPFEA), Fração metanólica (EPFEM).

### **AValiação DO POTENCIAL ANTITUMORAL:**

**Células:** Foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas, SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata) e HCT-116 (colon). As células foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em incubadora a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

**Amostras:** Todas as amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Seguindo o padrão do laboratório, extratos foram testados na concentração única de 50 µg/mL, enquanto que frações e substâncias puras foram testadas na concentração única de 25 µg/mL.

**Método:** A análise de citotoxicidade pelo método do MTT é um dos métodos utilizados no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato, tendo sido descrito primeiramente por Mosman (1983). Este método é capaz de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-

(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células tumorais foram plaqueadas nas concentrações  $0,1 \times 10^6$  cél/mL para as linhagens SF-295, PC-3 e  $0,7 \times 10^5$  cél/mL para a linhagem HCT-116. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com os compostos-teste e incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) a 1%, e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida, após dissolução do precipitado em 150 µL de DMSO puro, em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Análise Estatística: Os experimentos foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular, usando o programa *GraphPad Prism*.

## Resultados e Discussão

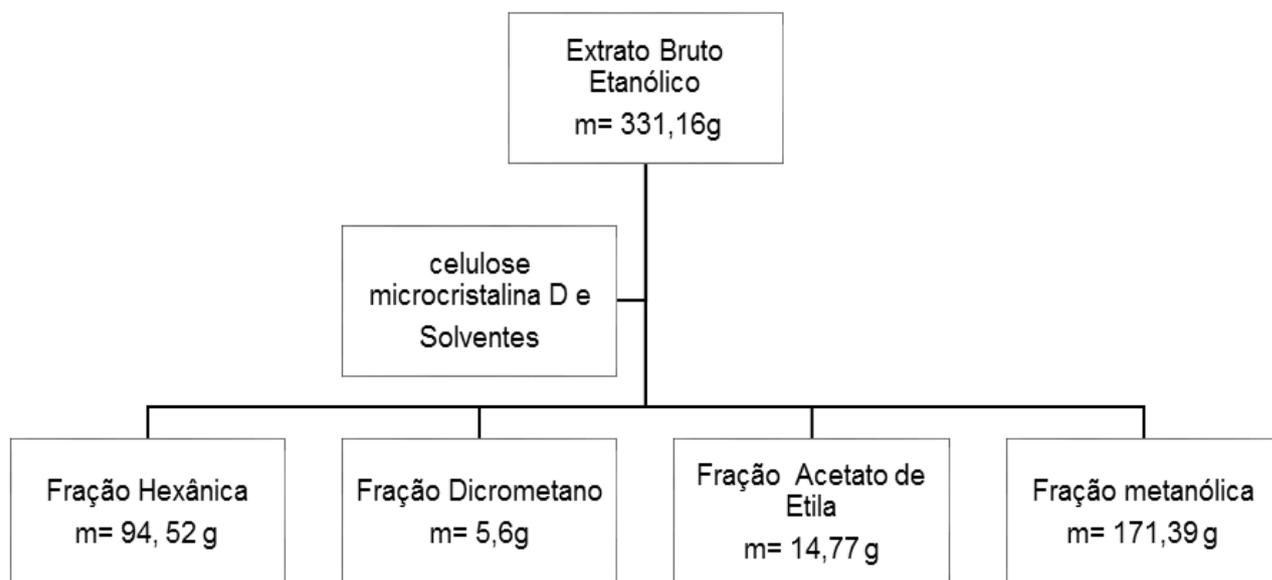
### **MATERIAL BOTÂNICO E FRACIONAMENTOS:**

As folhas da planta *Esenbeckia pumila* Pohl (RUTACEAE) foram coletadas obtendo 3100 g de massa das folhas frescas. Após lavadas e secas obteve-se a massa de 1280 g, devido à perda de umidade presente no material botânico. A massa obtida é considerada aceitável para a obtenção do extrato bruto e conseqüentemente dos extratos fracionados com massa significativas para a realização dos testes posteriores.

Após as sucessivas extrações a frio obteve-se 331,16 g de extrato bruto etanólico seco. A temperatura na extração é de extrema importância, pois temperaturas elevadas podem degradar alguns metabólitos secundários presente no material vegetal.

O fracionamento do extrato bruto foi realizado conforme demonstrado na **Figura 1**.

**Figura 1:** Fracionamento do extrato bruto



A diferença das massas obtidas de cada fração explica-se devido à diferença da quantidade de metabólitos secundários com diferentes polaridades presente na planta.

### **AValiação DO POTENCIAL ANTITUMORAL:**

Foram testados 5 extratos a fim de verificar o potencial citotóxico destas frente à três linhagens de células tumorais. A amostra identificadas pelo número **1** foi testada na concentração única de 50 µg/mL; as amostras identificadas pelos números **2, 3, 4, 5** foram testadas na concentração única de 25 µg/mL (**Tabela 1**). Foram considerados citotóxicos, aqueles compostos capazes de inibir acima de 75% da proliferação celular.

**Tabela 1** – Percentual de inibição do crescimento tumoral *in vitro* na concentração única de 50 µg/mL para o extrato identificado pelo número 1, e de 25 µg/mL para os extratos identificados pelos números 2, 3, 4, 5.

Amostras	SF-295		PC-3		HCT-116	
	IC (%)	DP(%)	IC (%)	DP(%)	IC (%)	DP(%)
1- EPFE	49,06	2,88	22,56	0,24	41,08	0,86
2- EPFEH	26,45	7,13	19,61	0,48	42,30	2,43
3- EPFED	75,50	1,30	63,36	5,26	94,99	0,62
4- EPFEA	27,08	3,08	32,09	1,22	0,00	0,00
5- EFEM	12,48	3,84	20,57	2,32	0,00	0,00

Legenda: IC – Inibição do Crescimento; DP – Desvio Padrão.

A partir da **Tabela 1** é possível verificar que apenas um extrato apresentou efeito citotóxico frente às linhagens de células tumorais testadas (destacados em azul). O extrato 3 apresentou efeito antiproliferativo em SF-295 e HCT-116. Um resultado satisfatório com 94,99% de inibição de crescimento contra linhagem de célula de colon, e 75,50% contra linhagem de célula de glioblastoma. As outras amostras não apresentaram percentual de inibição celular acima de 75% sendo consideradas assim não citotóxicas frente à essas três linhagens de células testadas.

### Considerações Finais

Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que as massas obtidas tanto do extrato bruto etanólico quanto a das frações foram suficientes para a realização dos testes, sendo possível avaliar a citotoxicidade dos extratos das folhas de *Esenbeckia pumila* Pohl (RUTACEAE) frente a linhagens de células tumorais.

A fração diclorometânica (EPFED) mostrou-se citotóxica para duas linhagens de células SF-295 e HCT-116 (glioblastoma e colon); quanto as outras amostras foram consideradas não citotóxicas. Os resultados foram satisfatórios e promissores, direcionando na continuidade da pesquisa.

### Agradecimentos

A Universidade Estadual de Goiás (UEG) pelo apoio financeiro, Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e ao Programa de Bolsa e Incentivo à Pesquisa e Produção Científica (PROBIP-UEG).

### Referências

BARROS FILHO, B. A.; NUNES, F. M.; OLIVEIRA, M. C. F.; ANDRADE NETO, M.; MATTOS, M. C.; BARBOSA, F. G.; MAFEZOLI, J.; PIRANI, J. R. Metabólitos

secundários de *Esenbeckia almawillia* Kaastra (RUTACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1589-1591, 2007.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p.14-19, 1996.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZILO, V. R.; MATOS, D. S.; GERMANO, A. M.; JAMAL, C. M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, 2008.

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

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUZA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, 2006. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_04\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf)>. Acesso em: agosto de 2016.

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.

NOGUEIRA, R. C.; CERQUEIRA, H. F.; SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecular from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic patents**, v.20, n.2, p. 145-157, 2010.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

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

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.