

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Lithraea brasiliensis* E *Lithraea molleoides* (ANACARDIACEAE)

RAFAEL MARTINS LOPES^{1,2,3}, GUILHERME FOSSÁ⁴, ALINE FOSSÁ^{1,5}, CARLOS ALEXANDRE FEDRIGO³, SANDRA GASPARY DA MATTA³, KÁTIA REGINA BICCA MACHADO^{2,3}, MARA NETTO BENETTI³, SÉRGIO AUGUSTO LORETO BORDIGNON^{2,3,6}, DENISE HEIDRICH FARIA^{2,3,7}, ANDRÉA GISIANE KUREK³, LUCIANA SPERB TONDING³, MIRIAM ANDERS APEL³, GILBERTO SCHWARTSMANN³, IVANA GRVICICH^{2,3,8}, ADRIANA BRONDANI DA ROCHA^{2,3,9}

RESUMO

O gênero *Lithraea* pertence à família *Anacardiaceae* e está representada no Rio Grande do Sul por duas espécies, *L. brasiliensis* e *L. molleoides*, conhecidas popularmente como aroeira-brava e aroeira-branca, respectivamente. De acordo com revisão realizada na literatura especializada, somente para a espécie *L. molleoides* foram relatados estudos de atividade antimicrobiana, antiviral e citotóxica, sendo esta última testada contra carcinoma hepatocelular humano (Hep G2). Com base nesses dados, foi coletada em Viamão a espécie *L. brasiliensis* e em Paraíso do Sul, *L. molleoides*, para avaliação de seu

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia – Bolsista PROICT/ULBRA

² Centro de Pesquisas em Ciências Médicas – CPCM

³ Fundação SOAD

⁴ Acadêmico do Curso de Biologia – Bolsista PROICT/ULBRA

⁵ Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA

⁶ Professor do Curso de Biologia/ULBRA Gravataí

⁷ Professora do Curso de Biologia/ULBRA

⁸ Professora do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

⁹ Professora – Orientadora do Curso de Medicina/ULBRA (brondani@terra.com.br)

efeito citotóxico em linhagens celulares derivadas de tumores humanos. Neste estudo, foram preparados extratos orgânicos (etanólico) e aquosos a partir de folhas e galhos secos e adicionados em linhagens celulares provenientes de carcinoma de cólon (HT29) e carcinoma pulmonar de células não-pequenas (H460) humanos. A determinação da atividade citotóxica foi avaliada após 72 horas de incubação pelo ensaio de Sulforodamina B (SRB). Apresentaram efeito citotóxico os extratos orgânicos de folhas para *L. brasiliensis* e de folhas e galhos para *L. molleoides*. Num primeiro momento, foi realizado o fracionamento a partir do extrato ativo de *L. brasiliensis*, utilizando solventes de polaridades crescente (hexano, clorofórmio e metanol), sendo estes testados para determinação de IC50 (quantidade necessária de extrato para inibir 50% do crescimento celular) frente a cinco linhagens de células tumorais: HT29, H460, RXF393 (carcinoma renal), MCF7 (carcinoma de mama) e OVCAR3 (carcinoma de ovário). Os experimentos evidenciaram a presença de compostos ativos para as frações hexânica e clorofórmica. Os valores de IC50 encontrados foram: 17,63; 3,54; 7,11; 8,28 e 2,96 mg/mL para a fração hexânica e >50; 7,32; 16,67; 9,16 e 3,33 mg/mL para a fração clorofórmica, contra HT29, H460, RXF393, MCF7 e OVCAR3, respectivamente. Essas frações ativas encontram-se atualmente na fase de separação e purificação bioguiada dos compostos ativos.

Palavras-chave: anticâncer, extratos vegetais, linhagens celulares.

ABSTRACT

The genus *Lithraea* from Anacardiaceae family is represented in the state of Rio Grande do Sul by two species, *L. brasiliensis* and *L. molleoides*, vernacular name *aroeira-brava* and *aroeira-branca*, respectively. As some research in specialized magazines revealed that only *L. molleoides* shown anti-microbial, anti-viral, and cytotoxic activity. The cytotoxic activity was test on human hepatocellular carcinoma (Hep G2). Using those data, the species *L. brasiliensis* and *L. molleoides* were collected, from the city of Viamão and Paraiso do Sul, respectively, for cytotoxic evaluation. They were tested in tumor cell lines. For this study, organic (ethanol) and aqueous extracts were prepared from dried leafs and steams. Those extracts were tested on colon carcinoma cell line (HT29) and non-small cells lung cancer (H460). The cytotoxic activity was evaluated after 72 hours using the Sulforhodamine B (SRB) protein dye assay. The results shown cytotoxic effect on the *L. brasiliensis* leafs organic extract and leafs and steams organic extracts for *L. molleoides*. After that, Using hexane, chloroform and methanol, the active extract from *L. brasiliensis* was purified and tested in five cell lines tumors (HT29, H460, RXF393, MCF7 and OVCAR3) to find the *Ic*50 doses. These experiments shown some active compounds from the hexanic and chloroformic fractions. The *Ic*50 values found were: 17,63; 3,54; 7,11; 8,28 and 2,96 mg/mL from the chloroformic extracts for HT29, H460, RXF393, MCF7 and OVCAR3, respectively . Right now these active fractions from those active compounds has been separated and bioguided purified.

Key words: anticâncer, vegetal extracts, cell lines.

INTRODUÇÃO

A investigação de novas drogas contra o câncer é um tema que nos últimos anos tem justificado esforços na comunidade científica. Na busca por novos agentes com ação antineoplásica, milhares de substâncias já foram submetidas à triagem em laboratórios em vários países. Estas substâncias são de origem natural ou sintéticas. Entretanto, apenas algumas dezenas delas se mostraram realmente úteis e acabaram por gerar novos medicamentos. Neste particular, destacam-se vários agentes derivados de produtos naturais, como por exemplo a Vincristina, droga utilizada no tratamento das leucemias, que é derivada de uma planta que cresce na floresta tropical de Madagascar, *Catharanthus roseus*. Sendo assim, o Brasil que possui mais de 30% das áreas florestais tropicais do planeta, abriga uma diversidade ecológica incalculável oferecendo uma fonte de recursos naturais para a pesquisa de novas drogas com potencial anticâncer [CRAGG 1997, CRAGG 1999, MANS 2000].

O gênero *Lithraea* pertence à família Anacardiaceae e está representada no Rio Grande do Sul por duas espécies, *L. brasiliensis* e *L.*

molleoides, conhecidas popularmente como aroeira-brava e aroeira-branca, respectivamente. De acordo com revisão realizada na literatura [ALE 1997], a espécie *L. molleoides* pode apresentar atividade antimicrobiana, antiviral e citotóxica [RUFFA 2002]. Com base nestas informações, nossa equipe selecionou as duas espécies para a avaliação do potencial citotóxico em linhagens celulares derivadas de tumores humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do Material Vegetal

As espécies *Lithrea brasiliensis* e *Lithrea molleoides* (figura 1) foram coletadas em Viamão e em Paraíso do Sul, respectivamente. A identificação e o registro botânico das plantas estudadas foi realizado. As exsicatas destas plantas encontram-se no Herbário da ULBRA (HERULBRA) [MANS 2000].

A)



Foto: Sérgio Bordignon

B)



Foto: Sérgio Bordignon

Figura 1 - A) *Lithrea brasiliensis*. B) *Lithrea molleoides*.

Preparação dos Extratos

As partes aéreas das plantas foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 35°C e posteriormente trituradas. Dois tipos de extratos foram preparados: um extrato orgânico (etanólico, 1:10) e um extrato aquoso (1:10). A maceração foi realizada durante 48 horas, à temperatura ambiente durante a produção do extrato orgânico e sob refrigeração (4°C) na preparação do extrato aquoso. Posteriormente, os extratos foram filtrados, concentrados em evaporadores rotativos (extratos orgânicos) ou liofilizados (extratos aquosos) e armazenados à -20 °C [MANS 2000].

Testagem in vitro

O efeito citotóxico dos extratos foi testado nas linhagens celulares derivadas de tumores humanos HT-29 (carcinoma de cólon) e NCI-H460 (carcinoma de células não-pequenas de pulmão). As linhagens foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 contendo 10% de FCS, em atmosfera umidificada à 95%, com 5% de CO₂ à 37°C. Para os testes, as células foram inoculadas em placas de 96 cavidades e incubadas por 24 h. Após este período, os extratos orgânicos foram solubilizados em DMSO (Dimetilsulfóxido, 0,25%) e meio de cultura, enquanto os extratos aquosos foram solubilizados diretamente no meio de cultivo. Os extratos foram adicionados às placas e mantidos por 72 horas na concentração de 100 µg/mL. A determinação do crescimento celular foi realizada através do método colorimétrico com Sulforodamina B (SRB) [SKERAN 1990, MONKS 1991, MANS 2000]. Os extratos foram considerados citotóxicos quando os valores de densidade ótica à 540nm foram inferiores ao valor de referência (crescimento celular após 24 h sem adição de extrato, denominado T0). Os

dados produzidos foram plotados (Figura 2), subtraindo-se onde os valores de T0 dos valores dos controles (células que não receberam extratos e cresceram livremente) [GREVER 1992, BOYD 1995].

Fracionamento

Os extratos que apresentaram atividade citotóxica foram submetidos ao processo de fracionamento com solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e metanol para posterior avaliação do seu valor de IC50.

Estudos de Inibição do Crescimento Celular

Os valores de IC50 (concentração de extrato que provoca inibição de 50% de crescimento celular) foram determinados nas linhagens celulares HT29, NCI-H460, RXF393 (carcinoma renal), MCF7 (carcinoma de mama) e OVCAR3 (carcinoma de ovário) para cada um dos extratos que apresentaram atividade citotóxica na testagem in vitro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para o estudo do efeito citotóxico estão demonstrados na Figura 2. Os extratos com maior atividade foram os de folhas e galhos orgânico de *L. brasiliensis* e galhos orgânico de *L. molleoides*, ambos nas linhagens HT29 e NCI-H460.

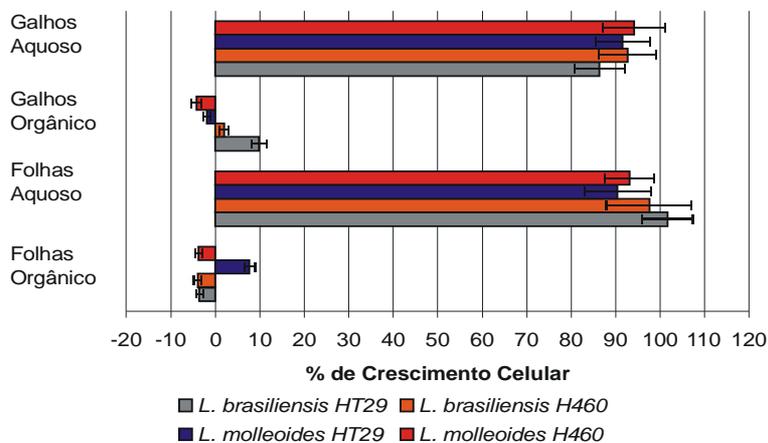


Figura 2 - Efeito citotóxico dos extratos brutos (100 $\mu\text{g/ml}$) de *L. brasiliensis* e *L. molleoides* em HT29 e H460. São considerados extratos com efeito citotóxico os que se encontram com valores inferiores aos do tempo zero (T_0). Os extratos orgânicos de folhas, galhos apresentaram citotoxicidade obtendo os menores valores.

O extrato orgânico produzido a partir das folhas de *L. brasiliensis* foi arbitrariamente selecionado para dar início ao fracionamento. Deste, a fração metanólica resultante, não pode ser testada devido ao baixo rendimento. Enquanto a fração hexânica promoveu inibição de crescimento em todas as linhagens testadas com valores de IC50 mais baixos do que os valores observados para a fração clorofórmica. Na fra-

ção clorofórmica os valores de IC50 foram variáveis dentre as linhagens estudadas HT29 ($>50 \mu\text{g/mL}$), H460 ($7,32 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$), RXF393 ($16,67 \pm 0,86 \mu\text{g/mL}$), MCF7 ($9,16 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$) e OVCAR3 ($3,33 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$). A observação da atividade mais moderada desta fração pode ser parcialmente explicada pela existência de resíduos remanescentes da extração hexânica (Figura 3 e Tabela 1).

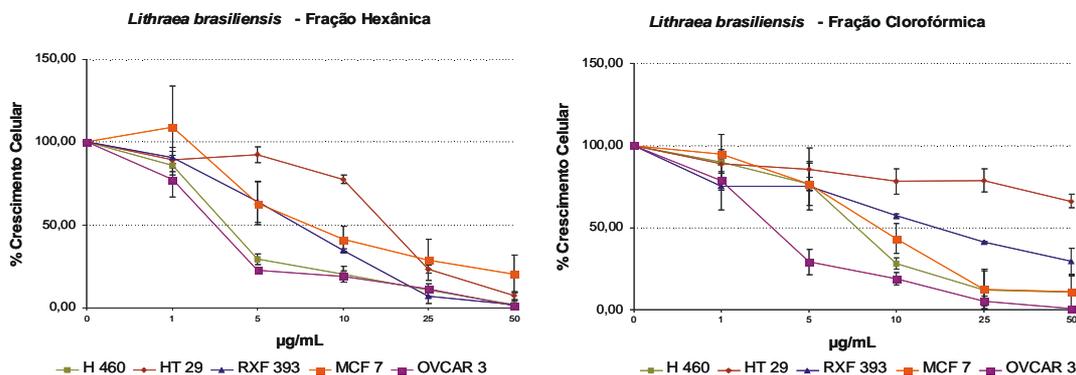


Figura 3 - Curvas de dose-resposta (0-50 $\mu\text{g/ml}$) das frações hexânica (A) e clorofórmica (B) de *L. brasiliensis* em HT29, H460, RXF393, MCF7 e OVCAR3.

Tabela 2 - Resultados de IC50 das frações de *L. brasiliensis*

Fração	IC ₅₀ µg/mL				
	HT 29	H 460	RXF 393	MCF 7	OVCAR 3
Hexânica	17,63 ± 0,53	3,54 ± 0,31	7,11 ± 1,08	8,28 ± 1,12	2,96 ± 0,35
Clorofórmica	>50	7,32 ± 0,55	16,67 ± 0,86	9,16 ± 1,09	3,33 ± 0,53

CONCLUSÕES

As frações hexânica e clorofórmica de *L. brasiliensis* apresentaram significativa atividade citotóxica nas linhagens celulares HT29 e NCI-H460 e baixos valores de IC50 nas linhagens HT29, NCI-H460, RXF393, MCF7 e OVCAR3 para as frações testadas, com exceção da fração clorofórmica na linhagem HT29. Os resultados sugerem que os compostos responsáveis pela atividade estejam entre substâncias apolares até média polaridade, com um grande poder citotóxico. Os estudos para isolamento e purificação dos compostos responsáveis por essa atividade, estão em andamento. A fração hexânica encontra-se em avançado processo de separação e purificação bioguiada dos compostos ativos. Posteriormente será dada continuidade ao estudo do efeito citotóxico de *L. molleoides*, bem como a comparação dentre os compostos ativos nas duas espécies e a elucidação estrutural destas substâncias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALE, S. I. et al. Allergic contact dermatitis caused by *Lithraea molleoides* and *Lithraea brasiliensis*: identification and characterization of the responsible allergens. **American Journal of Contact Dermatitis**, v.8, n.3, p.144-149, 1997.

BOYD, M. R; PAULL, K. D. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *In vitro* anticancer drug discovery screen. **Drug Development Research**, v. 34, p. 91-109, 1995.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; WEISS, R. B. Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. **Seminars in Oncology**, v.24, p.156-163, 1997.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation**, v.17, p.153-163, 1999.

GREVER, M. R.; SCHEPARTZ, S. A.; CHABNER, B. A. The National Cancer Institute: Cancer Drug Discovery and Development Program. **Seminars in Oncology**, v.19, n.6, p.622-638, 1992.

MANS, D. R.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologist**, v.5, n.3, p.185-198, 2000.

MONKS. A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, n.11,

p.757-766, 1991.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.;
SCHWARTSMANN, G. Natural products in
anticancer therapy. **Current Opinion
Pharmacology**, v.1, n.4, p.364-369, 2001.

RUFFA, M. J. et al. Cytotoxic effect of
Argentine medicinal plant extracts on

human hepatocellular carcinoma cell line.
Journal of Ethnopharmacology, v.79, n.3,
p.335-339, 2002.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric
cytotoxicity assay for anticancer-drug
screening. **Journal of the National
Cancer Institute**, v.82, n.13, p.1107-1112,
1990.