

# ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Piper xylosteoides* STEUD

RAFAEL MARTINS LOPES<sup>1,2,3</sup>, DENISE HEIDRICH FARIA<sup>1,2</sup>, CARLOS  
ALEXANDRE FEDRIGO<sup>1</sup>, MELISSA PERIN<sup>1</sup>, LUCIANA SPERB  
TONDING<sup>1</sup>, MARA NETTO BENETTI<sup>1</sup>, ANDRÉA GISIANE KUREK<sup>2</sup>,  
SÉRGIO AUGUSTO DE LORETO BORDIGNON<sup>1,2</sup>, KÁTIA REGINA BICA  
MACHADO<sup>1</sup>, MIRIAM ANDERS APEL<sup>2</sup>, GILBERTO SCHWARTSMANN<sup>1,2</sup>,  
ADRIANA BRONDANI DA ROCHA<sup>1,2,4</sup>

## RESUMO

*Algumas espécies da família Piperaceae, tais como: Piper betle, Piper aboescens e Piper nigrum têm sido relatadas na literatura por apresentarem substâncias com atividade citotóxica. A espécie Piper xylosteoides foi coletada no Estado do Rio Grande do Sul para investigação da atividade citotóxica. Inicialmente, extratos orgânicos e aquosos foram preparados a partir de folhas e galhos secos e adicionados em cultivos de linhagens celulares provenientes de adenocarcinoma de células não pequenas de pulmão (NCI-H460) e carcinoma de cólon retal (HT29) derivadas de humanos. A atividade citotóxica foi avaliada após 72 horas de incubação pelo ensaio de Sulfurodamina B (SRB), tendo sido encontrado resultado positivo para o extrato orgânico de folhas e galhos. A partir do extrato ativo foi realizado fracionamento com solventes de polaridade crescente (hexano e clorofórmio). Os experimentos evidenciaram a presença de compostos ativos tanto na fração hexânica como na clorofórmica desta espécie, sendo os menores valores de IC<sub>50</sub> (concentração de extrato necessária para promover inibição de 50% do crescimento celular) encontrados para a segunda fração: 0,62 e 0,66 µg/ml nas linhagens HT29 e NCI-H460, respectiva-*

<sup>1</sup>Centro Integrado do Câncer (CINCAN)/ULBRA

<sup>2</sup>South American Office for Anticancer Drug Development (SOAD)

<sup>3</sup>Acadêmico do Curso de Farmácia - Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>4</sup>Professora - orientadora do Curso de Medicina/ULBRA

mente. Esta fração ativa encontra-se atualmente na fase de separação e purificação bioguiada de seus compostos ativos.

## ABSTRACT

Some species of the Piperaceae family have been mentioned by presenting cytotoxic activity such as Piper betle, Piper aborescens and Piper nigrum. Piper xylosteoides has been collected in Rio Grande do Sul so that its cytotoxic activity could be assessed. First, organic and aqueous extracts were prepared from dry leaves and stems, which had been inoculated in cultivated human non-small cell lung cancer cell lines (NCI-H460) and also human colorectal carcinoma cell lines (HT29). The cytotoxic activity was evaluated after a 72-hour-incubation, with Sulforhodamine B (SRB), with positive result for the organic extract from leaves and stems. Fractionation was then carried out from the active extract, by adding increasing polarity solvent (hexane and chloroform). The experiment showed evidence of active compounds in both, hexanic and chloroformic fractions, and the best values of  $IC_{50}$  have been found to the second fraction: 0,62 and 0,66  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on both HT29 and NCI-H460 cell lines, respectively. The active fraction is currently under selection to be purified for its active components.

## 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, centenas de 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

de ecológica incalculável oferecendo uma fonte de recursos naturais para a pesquisa de novas drogas com potencial anticâncer [1].

O gênero *Piper*, que pertence à família das Piperaceae e compreende aproximadamente 2000 espécies no mundo, tem sido usado pela suas propriedades medicinais, além de que um grande número de produtos naturais bioativos são relatados para os extratos destas espécies [2,3]. Desta forma, este gênero parece ser uma promissora fonte de matéria-prima para a investigação de novas drogas. Muitas espécies de *Piper* têm sido utilizadas na medicina popular, como por exemplo, extratos de *P. aduncum* L. que foram usados para o tratamento de queimaduras além de que estudos com esta espécie mostraram atividade antiviral [4]. *P. lanceaefolium* HBK. foi utilizada para o tratamento de infecções da pele [5], *P. longum* L. é utilizada popularmente contra bronquites e como

carminativo além de apresentar uma ação citotóxica [6], *P. nigrum* assim como *P. betle* mostraram uma variedade de atividades farmacêuticas, como por exemplo: antifúngica, anti-diarréica, anti-inflamatória, antileucêmica assim como inibidor de 5-lipoxigenase e ciclooxigenase-1 (*P. nigrum* apenas) [7]. *P. methysticum* é usado na medicina alternativa especialmente para o tratamento de ansiedade [8] e, por fim, alguns alcalóides foram isolados da *P. arborescens* e demonstraram atividade citotóxica [9].

Portanto, nosso estudo investiga a atividade citotóxica da espécie *Piper xylosteoides* em linhagens derivadas de tumores humanos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta do Material Vegetal

O material vegetal foi coletado em São Francisco de Paula (RS). Após a identificação foi realizado o registro botânico da planta estudada. A exsicata desta espécie foi depositada no Herbário da ULBRA (HERULBRA) [10].

### Preparação dos Extratos

Folhas, galhos e raízes foram selecionados e secos à temperatura ambiente durante uma semana e posteriormente triturados. Dois tipos de extratos foram preparados: um extrato orgânico (etanólico) e um extrato aquoso. A maceração foi realizada durante 48 horas, à temperatura

ambiente. Posteriormente, os extratos foram filtrados, concentrados em evaporadores rotatórios (extratos orgânicos) ou liofilizados (extratos aquosos) e armazenados à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes de serem submetidos aos ensaios biológicos em linhagens de células tumorais humanas, os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos com meio de cultura até uma concentração final *in vitro* de 0,25% em volume. Esta concentração não possui efeito inibidor de crescimento celular e foi utilizado como controle [10].

### Testagem *in vitro*

O efeito citotóxico dos extratos foi testado na linhagem de células HT29 (adenocarcinoma de cólon humano). As células foram inoculadas em placas de 96-wells. Após 24h os extratos foram adicionados ( $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) e mantidos em cultivo durante 72 horas. A determinação do crescimento celular foi realizada através do método colorimétrico com Sulforodamina B (SRB) [11]. Os extratos foram considerados citotóxicos quando os valores de densidade óptica foram inferiores ao valor de referência (tempo zero, crescimento celular após 24hs sem adição de extrato,  $T_0$ ). O valor de referência foi produzido pela adição de ácido tricloroacético (TCA 50%) às células, antes da adição dos extratos. Os extratos que apresentaram atividade citotóxica foram submetidos à fracionamento com solventes de polaridade crescente (hexano e clorofórmio). Estas frações foram testadas novamente para avaliar os valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentração de extrato que inibe 50% do crescimento celular), nas linhagens HT29 e NCI-H460 (carcinoma de células não pequenas de pulmão) [10].

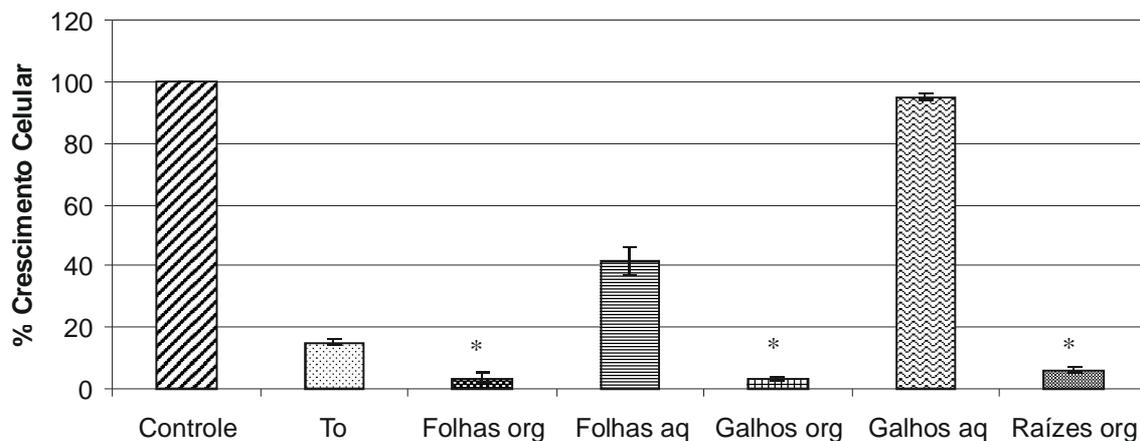
## Análise estatística

Os valores estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram avaliados por Teste "t" de Student para determinar a diferença estatística (software *Instat*, Versão 2.0 –Graphpad Software, Inc.). Diferenças acima de 95% do intervalo de confiança ( $P < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através do ensaio de citotoxicidade para os extratos brutos estão ex-

pressos na Figura 1. Os extratos que apresentaram atividade citotóxica foram folhas, galhos e raízes, da extração orgânica. Estes extratos foram então retestados num painel de 60 linhagens celulares tumorais humanas, distribuídas em nove tipos de tecido (leucemia, sistema nervoso central, pulmão, mama, cólon retal, rim, ovário, próstata e melanoma) no Instituto Nacional do Câncer (NCI), nos Estados Unidos, organização que mantém um programa de aquisição de novos compostos com potencial atividade contra câncer. Os extratos promoveram efeito citotóxico em concentrações muito baixas, sugerindo uma toxicidade elevada neste amplo painel de células e pouca seletividade quanto a este efeito. Entretanto, este instituto sugeriu a continuidade da avaliação do estudo do extrato orgânico de folhas.



**Figura 1** - Efeito citotóxico dos extratos brutos ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) de *Piper xylosteoides* em HT29. São considerados extratos com efeito citotóxico os que se encontram com valores inferiores aos do tempo zero (To). Os extratos orgânicos de folhas, galhos e raízes apresentaram citotoxicidade obtendo os menores valores (\* $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ).

Após a análise do NCI, o extrato de folhas orgânico foi fracionado com solventes de polaridade crescente (hexano e clorofórmio) e submetido à determinação do valor de IC<sub>50</sub>. Os resultados obtidos demonstraram inibição de crescimento tanto para a fração hexânica como para a clorofórmica e estão demonstrados na Figura 2 e na Tabela 1. Para ambas as frações foi observado citotoxicidade nas duas linhagens celulares testadas.

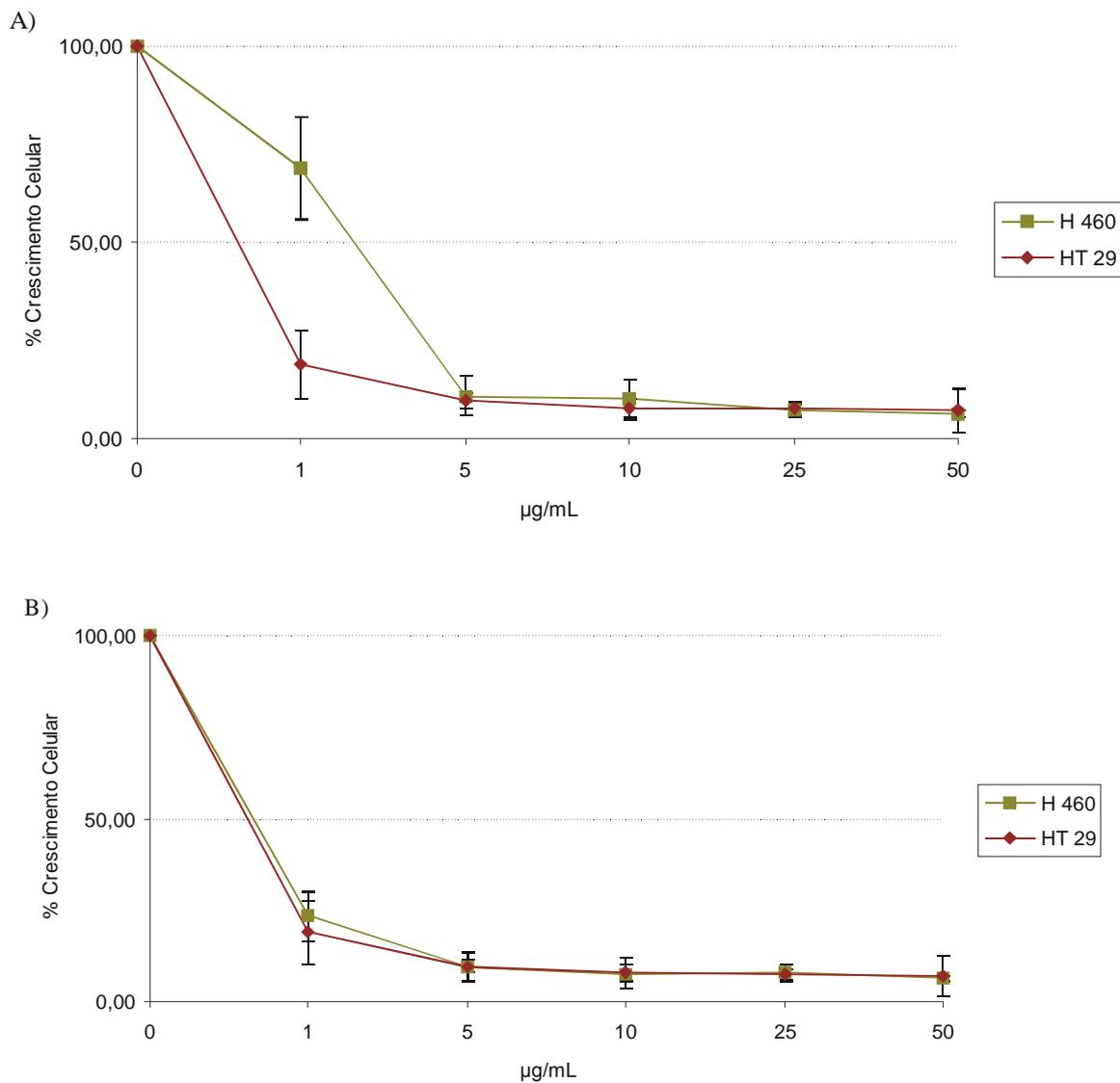
Os resultados obtidos demonstram potencial atividade citotóxica para *P. xylosteoides*. Os experimentos evidenciaram a presença de compostos ativos tanto na fração hexânica como na clorofórmica desta espécie, sendo os menores

valores de IC<sub>50</sub> encontrados para a segunda fração: 0,62 e 0,66 µg/ml nas linhagens HT29 e NCI-H460, respectivamente.

Os resultados sugerem que os compostos responsáveis pela atividade estejam entre substâncias apolares até média polaridade, com um grande poder citotóxico, onde não podemos descartar toxicidade, não elucidando muito a respeito da classe de metabólitos secundários a que pertencem. Estas frações encontram-se atualmente na fase de separação e purificação bioquímica de suas substâncias ativas para um posterior isolamento e identificação do composto com atividade.

**Tabela 1** - Valores de IC<sub>50</sub> para as frações hexânica e clorofórmica do extrato de folhas orgânico de *Piper xylosteoides* em HT29 e NCI-H460.

	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	HT 29	NCI-H 460
<i>P. xylosteoides</i> folhas orgânico hexano	2,60 ± 0,88	2,22 ± 0,66
<i>P. xylosteoides</i> folhas orgânico clorofórmio	0,62 ± 0,07	0,66 ± 0,06



**Figura 2** - Curvas de dose-resposta (0-50 µg/ml) das frações hexânica (A) e clorofórmica (B) de *Piper xylosteoides* em HT29 e NCI-H460. Estas curvas demonstram os baixos valores de IC<sub>50</sub>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MANS, D.R.A.; ROCHA, A.B. da; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anticancer compounds. **Oncologist**, v.5, p.185-198, 2000.
2. PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E. ; BOLLA, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v.46, n.4, p.597-673, 1997.
3. PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; GUPTA, S.; TALWAR, S.; RAJWANSHI, V. K.; KUMAR, R.; AZIM, A.; MALHOTRA, S.; KUMAR, N.; JAIN, R.; SHARMA, N. K.; TYAGI, O. D.; LAWRIE, S. J.; ERRINGTON, W.; HOWARTH, O. W.; OLSEN, C. E.; SINGH, S. K.; WENGEL, J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. **Phytochemistry**, v.49, n.4, p.1069-1078, 1998.
4. DEVEHATA, F. L.; BAKHTIAR, A.; BEZIVINA, C.; AMOROSA, M.; BOUSTIEA, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. **Fitoterapia**, v.73, p.400-405, 2002.
5. LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.189-196, 2001.
6. PADMAJA, R.; ARUN, P.C.; PRASHANTH, D.; DEEPAK, M.; AMIT, A. ; ANJANA, M. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v.73, p.508-510, 2002.
7. STOHR, J.R.; XIAO, P.G.; BAUER, R. Constituents of Chinese *Piper* species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n.2/3, p.133-139, 2001.
8. SINGH, Y.N.; SINGH, N.N. Therapeutic potential of kava in the treatment of anxiety disorders. **CNS Drugs**, v.16, n.11, p.731-743, 2002.
9. CHANG-YIH, D.; YANG-CHANG, W.; SHANG-KWEI, W. Cytotoxic Pyridone Alkaloids from *Piper aborescens*. **Phytochemistry**, v.29, n.8, p.2689-2691, 1990.
10. MONKS, N.R.; FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MACHADO, K. R.; LIMA, M. F. S.; ROCHA, A. B. da; SCHWARTSMANN, G. *In vitro* Cytotoxicity of Extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmaceutical Biology**, v.40, n.7, p.494-500, 2002.
11. SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal National Cancer Institute**, v.82, p.1107-1112, 1990.