



## **ATIVIDADE ANTITUMORAL E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO METANÓLICO DE *Jodina rhombifolia* Hook et Arn**

**COSTA, Juliana Hartleben da<sup>1</sup>; SILVA, Viviane Maciel<sup>2</sup>; SASSI, Juliana Saraçol<sup>3</sup>; DEL PINO, Francisco Augusto Burkert<sup>4</sup>; BEIRA, Fátima Teresa Alves<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup>Bolsista BIC -FAPERGS e Graduada de Licenciatura em Ciências Biológicas – IB/UFPeI

<sup>2</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ/UFPeI

<sup>3</sup>Graduada de Licenciatura em Ciências Biológicas – IB-UFPeI

<sup>4</sup>Professor do Departamento de Bioquímica – IQG/UFPeI

<sup>5</sup> Professora do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – IB/UFPeI

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. juhartleben@ibest.com.br

### **1. INTRODUÇÃO**

As plantas medicinais são um tema de alta relevância na pauta da ciência brasileira e muitos estudos estão sendo realizados com intuito de explorar suas propriedades bioativas. As plantas medicinais são caracterizadas como fontes importantes de matéria-prima para a indústria farmacêutica. Técnicas combinatórias expandem o número dos compostos disponíveis para testes, originando uma quantidade relativamente elevada de produtos naturais entre as drogas disponíveis no mercado (Brito e Brito, 1993).

Recentemente, ensaios com produtos naturais têm demonstrado atividade biológica relevante e pronunciada, bem como resultados adversos aos seus correspondentes sintéticos, os alopáticos. São observadas também diferenças entre as propriedades químicas e estruturais dos compostos químicos naturais. Estas diferenças estruturais devem ser consideradas também entre os próprios produtos naturais, quando advindo de fontes diferentes, especialmente no desenvolvimento de princípios ativos da biodiversidade, relacionados a fatores como o clima, as safras e as espécies (Seidl, 2002).

A biota brasileira é composta por inúmeras espécies de plantas medicinais, entretanto, a maioria das plantas medicinais comercializadas no Brasil é de espécies introduzidas. Assim, as plantas medicinais endêmicas ainda são pouco conhecidas constituindo um fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento.

Neste contexto, o químico de produtos naturais não só pode estar envolvido no isolamento e identificação dos constituintes ativos, como também desenvolvendo pesquisas na tentativa de validação de métodos analíticos modernos visando o controle de qualidade destas plantas.

Em contrapartida, os inconvenientes ao uso de produtos naturais quando se busca produção em grande escala está na incerteza em se obter

quantidades suficientes de material, na variabilidade da composição das amostras, nas diferenças de atividades biológicas e na ausência de padrões que auxiliem o reconhecimento de determinadas estruturas químicas contidas nos extratos brutos (Pinto et al., 2002).

Uma das alternativas para minimizar os riscos à introdução de novos produtos na indústria farmacêutica é isolar os princípios ativos dos produtos naturais ainda brutos, e encurtar os tempos de pesquisa, o que conseqüentemente aumenta o grau de especialização requerido para estas. As descobertas e a manutenção de grupos exploratórios necessitam de dispendiosos incentivos para o desenvolvimento de seus programas (Cavalla, 1998).

Nessa perspectiva, este trabalho teve como objetivos avaliar *in vitro* a atividade antitumoral específica do extrato bruto metanólico de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn, através de fracionamentos por cromatografia de coluna, e parcialmente caracterizar frações com maior atividade antiproliferativa.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O extrato bruto metanólico de *Jodina rhombifolia* foi fracionado por cromatografia em camada sólida com resina de Sephadex LH-20<sup>®</sup>, indicada para produtos de origem natural, com baixo peso molecular.

Foram pesados 200g de resina, após foi adicionado como eluente álcool metílico, e deixado em repouso por um período de 3 horas para a hidratação, conforme fabricante (Biosciences). Posteriormente, foi vertida na coluna (80,0 cm x 3,15 cm) lentamente com auxílio de mangueira de sucção acoplada a uma bomba peristáltica, e a velocidade de escoamento foi ajustada para 1 mL/minuto.

Foram coletadas 18 frações em frascos de vidro em porções de 40 mL, o final do processo foi controlado por cromatografia de camada delgada, desenvolvida em acetato de etila: éter de petróleo (2:3), sendo aplicado como revelador permanganato de potássio e luz UV. As frações obtidas foram encaminhadas para o ensaio biológico (Xie et al., 2008)

No processo de cultivo celular e ensaio biológico, células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e fibroblastos de tecido embrionário de ratos (NIH-3T3) foram cultivadas em placas com 96 cavidades com meio de cultura DEMEM e suplementado com 10% de Soro bovino Fetal (SBF) em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, e então pré-incubadas por 24h (Tempo T<sub>0</sub>). Posteriormente, as células foram expostas a três diluições crescentes dos extratos (10 µL/mL; 60µL/mL; 100 µL/mL) e incubadas por mais 48h.

As determinações finais do crescimento celular foram realizadas após fixação das células com TCA, seguido de coloração com Sulforrodamina B (SRB). Determinou-se a densidade óptica em um Espectrofotômetro com Leitor de Placa ELISA a 492 nm. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Graph Pad Prism 4.0.

As frações biologicamente ativas foram selecionadas e caracterizadas parcialmente por infravermelho e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados três ensaios com as 18 frações metanólicas e a média destes valores foi expressa em percentuais de proliferação e/ou inibição celular conforme exposto na Tabela 1.

Pode-se observar que todos as frações apresentaram inibição do crescimento das células de MCF-7 em pelo menos uma concentração, com exceção das frações 6 e 17. No entanto, as frações 1, 2, 11, 12, 13 e 14 inibiram o crescimento celular nas três diluições testadas.

Quanto ao efeito nas células NIH-3T3 todas as frações demonstraram proliferação celular em pelo menos uma concentração. Contudo, as frações 6, 14, 17 e 18 proliferaram em todas as concentrações.

Interrelacionando os resultados foi possível perceber que, o melhor desempenho em valores de inibição de MCF-7 e proliferação de 3T3 foram dos extratos 1, 2, 12, 13, 14 e 15.

**Tabela 1:** Médias em porcentagem de proliferação e/ou inibição celular de linhagens de células tumorais MCF-7 e linhagens não tumorais NIH-3T3, frente a diferentes frações de extratos de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn.

FRAÇÕES	DILUIÇÕES (µL/mL)					
	MCF-7			NIH-3T3		
	10	60	100	10	60	100
1	<b>-36,44</b>	<b>-47,17</b>	<b>-91,86</b>	<b>68,25</b>	<b>46,62</b>	<b>-94,15</b>
2	<b>-13,11</b>	<b>-33,27</b>	<b>-84,12</b>	<b>33,54</b>	<b>31,96</b>	<b>-59,78</b>
3	39,47	3,01	-59,45	12,15	8,22	-60,73
4	51,32	40,87	-53,81	60,14	40,98	-56,92
5	74,16	59,95	-59,46	78,48	87,84	-2,99
6	84,41	72,4	16,27	106,89	57,06	38,18
7	35,43	34,59	-69,49	79,28	31,43	-74,78
8	44,58	-3,96	-69,91	49,74	19,12	-93,76
9	51,68	-14,11	-67,19	5,68	33,81	-97,03
10	13,69	-50,91	-58,65	53,53	-68,92	-47,55
11	-26,29	-68,37	-59,16	36,65	-31,26	-106,4
12	-13,39	-60,81	-61,59	44,43	0,08	-109,5
13	-22,01	-47,01	-66,59	82,69	36,99	-74,16
14	<b>-54,36</b>	<b>-63,22</b>	<b>-77,48</b>	<b>108,87</b>	<b>93,37</b>	<b>48,36</b>
15	-25,93	-35,89	-80,81	31,12	4,04	-100,3
16	96,02	44,85	-1,32	76,51	40,53	-51,76
17	85,58	31,32	18,97	58,21	52,39	19,06
18	197,2	122,2	-38,52	138,64	171,6	25,63

O melhor desempenho dentre as frações avaliadas, foram 1, 2 e 14, conforme, apresentado na Tabela 1, em que houve inibição frente à linhagem celular tumoral MCF-7 e proliferação na linhagem celular não tumoral NIH-3T3.

Diante dos resultados obtidos, as frações foram encaminhadas para caracterização parcial da estrutura química destes fitomedicamentos, por infravermelho e cromatografia gasosa, permitindo a identificação de metil ésteres dos ácidos graxos – éster do ácido mirístico (93%), éster do ácido esteárico (93%), éster do ácido oléico (92%), éster do ácido linoleico (93%) e éster do ácido linolênico (91%). Para as frações 1 e 2 do extrato bruto metanólico, e para a fração 14 foi identificado o éster do ácido mirístico (91%).

Segundo Felipe Júnior (2004), as células tumorais têm caracteristicamente um aumento da fluidez e uma diminuição da estabilidade da membrana citoplasmática, diferente de células saudáveis, cuja fluidez normal, promove a diferenciação celular. Assim, células neoplásicas são mais susceptíveis aos oxidantes e alguns ácidos graxos provocam a diminuição da fluidez de membrana das células tumorais do câncer de colo, mama, pâncreas humano e aumenta a viscosidade da membrana de células normais, conseqüentemente, sua estabilidade. Isto pode justificar a proliferação de células NIH-3T3 e a inibição de células MCF-7 contra os extratos de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn.

#### 4. CONCLUSÃO

O fracionamento do extrato bruto metanólico de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn permitiu o aumento da atividade específica frente a células neoplásicas, possibilitando a caracterização parcial de algumas substâncias bioativas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITO, A. R; BRITO, A. A .S; Forty years of Brazilian medicinal plant research, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, supl. 1, p. 53, 1993.

CAVALLA, D. Technology Providers and Integrators – A Virtual Architecture for Drug R&D In: Bristol, J. A. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, 1998, 33, p 365.

FELIPPE JÚNIOR, J.; Fluidez de menbrana: possivelmente o ponto mais fraco das células malignas. Associação Brasileira de Medicina Complementar, 2004. <http://www.medicinacomplementar.com.br/temamai04.asp#bib>, acessado em agosto de 2009.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quimica Nova**, 2002, 25, p. 45.

SEIDL, P. R. Pharmaceuticals from Natural Products: Current Trends, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2002, 74, p. 145.

SEPHADEX<sup>®</sup> LH-20, High performance chromatography of steroids, terpenoids and low molecular weight peptides – protocolo do fabricante, Amersham Bioscences.

XIE, G.; SCHEPETKIN, I. A.; SIEMSEN, D. W.; KIRPOTINA, L. N.; WILEY, J. A.; QUINN, M. Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartite*, **Phytochemistry**, 2008, 69, p. 1359.