

## **EFEITO CITOTÓXICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *VASSOBIA BREVIFLORA* EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10<sup>1</sup>**

### *CITOTOXIC EFFECT OF THE VASSOBIA BREVIFLORA HIDROALCOHOLIC EXTRACT IN B16F10 MURINE MELANOMA CELLS*

**Luciano Schmitt<sup>2</sup>, Alveir Rossato Viana<sup>3</sup>,  
Leticia Nascimento da Rosa<sup>4</sup>, Aline de Oliveira Fogaça<sup>4</sup>, Julien Wergutz<sup>5</sup>,  
Luciana Maria Fontanari Krause<sup>5</sup> e Aline Grohe Schirmer Pigatto<sup>6</sup>**

#### **RESUMO**

A busca por novos medicamentos que possam ser utilizados no tratamento do câncer tem mobilizado pesquisadores em todo o mundo. Os produtos naturais representam importante recurso para a descoberta e para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois são uma rica fonte de compostos biologicamente ativos. *Vassobia breviflora* (Sendtn.) Hunz. (Solanaceae), espécie nativa do Rio Grande do Sul, foi avaliada quanto ao seu potencial citotóxico. Investigou-se *in vitro* a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de folhas nas concentrações de 10, 30, 50, 70, 80 e 100 mg/mL frente à linhagem de células B16F10, pelo método de redução do MTT. Os resultados demonstraram uma redução na viabilidade das células de 86,4% e 88,2%, nas concentrações de 10 e 30 mg/mL, respectivamente. Dessa forma, os dados apresentados revelaram que o extrato de *V. breviflora* possui atividade citotóxica nas condições analisadas.

**Palavras-chave:** câncer, citotoxicidade, vitanolídeos.

#### **ABSTRACT**

*The search for new drugs that can be used in cancer treatment has instigated researchers around the world. Natural products represent an important resource for the discovery and development of new drugs, as they are a rich source of biologically active compounds. Vassobia breviflora (Sendtn.) Hunz. (Solanaceae), a native species of Rio Grande do Sul, was evaluated for its cytotoxic potential. In vitro, the cytotoxicity of its leaf hydroalcoholic extract at the concentration of 10, 30, 50, 70, 80 and 100 mg / mL was investigated with the B16F10 cell line by the MTT reduction method. The results demonstrated a reduction in cell viability from 86.4% to 88.2%, at concentrations of 10 and 30 mg / mL, respectively. Thus, the presented data revealed that V. breviflora extract has a cytotoxic activity under the analyzed conditions.*

**Keywords:** cancer, cytotoxicity, vitanolides.

<sup>1</sup> Trabalho Final de Graduação - TFG.

<sup>2</sup> Acadêmico do curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano. E-mail: luciano\_schmitt@hotmail.com

<sup>3</sup> Aluno do Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida - Centro Universitário Franciscano. E-mail: rossato.viana@hotmail.com

<sup>4</sup> Colaboradores. Curso de Farmácia - Centro Universitário Franciscano. E-mail: leticiasm2008@hotmail.com; alinefogaca@gmail.com

<sup>5</sup> Colaboradores. Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano. E-mail: wergutz.j@hotmail.com; lfontanari@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Orientadora. Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano. E-mail: agspigatto@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Os produtos naturais representam um importante recurso para a descoberta e para o desenvolvimento de novos medicamentos, pois são uma fonte rica de compostos biologicamente ativos (CRAGG; GROTHAUS; NEWMANN, 2009). De fato, a descoberta de novas substâncias que possam ser utilizadas para o tratamento e até mesmo para a cura de doenças é fundamental, tendo em vista a promoção do bem-estar da população e, também, do próprio avanço da ciência. Estudos de Newman, Cragg e Snader (2000, 2003) apontam que no período entre 1981 e 2002, mais da metade dos medicamentos novos que foram lançados no mercado eram derivados de produtos naturais. Isso evidencia a importância desses produtos como fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos.

A busca por novos medicamentos que possam ser utilizados para o tratamento do câncer tem mobilizado pesquisadores em todo o mundo. De acordo com Brandão et al. (2010, p. 9) “o câncer representa uma enfermidade cada vez mais comum em todo o mundo e a busca por moléculas cada vez mais potentes e menos tóxicas é constante [...]”.

Conceitua-se o câncer como um “grupo de doenças complexas, com comportamentos diferentes, conforme o tipo celular do qual se originam” (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013, p. 385). Na verdade, a palavra câncer, de origem latina (*cancer*) e significando “caranguejo”, deve ter sido empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante das células, que podem ser comparadas às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (ALMEIDA et al., 2005). A doença é caracterizada pelo crescimento desordenado e descontrolado de algumas células nas quais ocorrem mudanças fisiológicas que se transformam em células tumorais, alterando suas características e funções, o que resulta na perda de parâmetros para crescimento (HANAHAN; WEIBERG, 2000).

Considerada uma doença genética das células somáticas, origina-se preferencialmente de mutações em genes que controlam a multiplicação celular e, de acordo com Borges-Osório e Robinson (2013, p. 385), “o acúmulo dessas mutações torna o câncer a doença genética mais comum entre os humanos”.

Os fatores de risco dessa doença encontram-se no meio ambiente ou podem ser hereditários (INCA, 2016). A maioria dos casos está relacionada ao meio ambiente, no qual encontramos um grande número de fatores de risco. Entende-se por ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (quando insalubre), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos). As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem e os hábitos e estilos de vida adotados pelas pessoas podem determinar os diferentes tipos de câncer (ALMEIDA et al., 2005).

Conforme o INCA (2016), estima-se para o Brasil, entre 2016 e 2017, a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, o que torna essa doença um verdadeiro problema de saúde pública e reforça a necessidade urgente de busca de novas alternativas terapêuticas.

Dentre as muitas tentativas de prevenção e redução do número de casos de neoplasias, estudos com um grupo de substâncias químicas conhecidas como vitanolídeos têm sido muito promissores. Esses constituem substâncias naturais que podem ser definidas como lactonas esteroidais substituídas, em que o esqueleto básico apresenta um anel do tipo ergostano, que pode estar oxidado nos carbonos 22 e 26 ou nos carbonos 23 e 26 para formar uma  $\delta$  ou  $\gamma$  - lactona/lactol (PIGATTO; MENTZ; SOARES, 2014). Esse grupo de substâncias têm sido isolado de plantas de vários gêneros, como: *Acnistus*, *Datura*, *Jaborosa*, *Physalis*, *Vassobia* e *Withania*, todos da família Solanaceae, e despertam interesse por apresentarem diversas atividades biológicas, como antitumoral, diurética, atividade indutora de quinonaredutase e atividade imunossupressora (MINGUZZI; BARATA; CORDELL, 2011).

A família Solanaceae A. L. Jussieu é uma das maiores e mais complexas dentre as angiospermas, com 92 gêneros e cerca de 2.300 espécies, tendo a América do Sul como um dos principais centros de diversidade e endemismo (HUNZIKER, 2001). Essa família é conhecida em todo o mundo por ser bem difundida pelos mais diversos habitats. São anuais ou bienais, representadas por plantas rasteiras ou árvores.

Ratificando a importância das plantas enquanto recurso terapêutico, desde os anos 60, diferentes espécies da família Solanaceae vem sendo estudadas em função do seu potencial terapêutico (TOMASSINI et al., 2000). No presente trabalho, tem-se o gênero *Vassobia* como objeto de estudo, mais especificamente *Vassobia breviflora*, conhecida popularmente como esporão-de-galo. Essa espécie está presente na flora nativa do Rio Grande do Sul, sendo encontrada, principalmente, em ambientes antropizados (HUNZIKER, 2001).

Estudos já realizados com essa planta mostraram atividade citotóxica devido à presença de substâncias do grupo dos vitanolídeos. Smith e Baum (2006) conduziram um experimento no qual demonstraram que *V. breviflora* foi a mais citotóxica frente à experimento in vitro na linhagem celular HNSCC (linhagem celular de câncer de cabeça e pescoço).

Em outro estudo, Samadi et al. (2010) isolaram o composto ativo vitaferina A, a partir de extratos de *V. breviflora* e constataram atividade citotóxica induzida por apoptose em células de carcinoma de cabeça e pescoço.

Wergutz et al. (2016), em estudos preliminares utilizando extrato aquoso de folhas de *V. breviflora*, constataram elevada citotoxicidade em todas as concentrações testadas (10, 30, 50, 70, 80 e 100 mg/mL), sendo a extração a temperatura ambiente na concentração de 100 mg/mL a que mais apresentou atividade frente a uma linhagem de carcinoma de mama.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade celular do extrato hidroalcoólico de folhas de *V. breviflora* frente à linhagem celular B16F10.

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

O material botânico (folhas) de *V. breviflora* foi coletado em fevereiro de 2017, em uma propriedade particular no distrito de Boca do Monte, município de Santa Maria, RS. Trata-se da mesma população já coletada e identificada para a realização de estudos anteriores. A exsicata do material botânico encontra-se no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria - SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia), registrado sob o número 14.450.

### OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico, as folhas de *V. breviflora* passaram por um processo de secagem em estufa de circulação/renovação de ar, à temperatura de 40°C durante 48h. Em seguida, esse material foi moído em moinho de facas e macerado em álcool etílico 80% durante três dias à temperatura ambiente. O material resultante foi filtrado e rotaevaporado a pressão reduzida, a 40°C obtendo-se o extrato bruto.

### LINHAGEM CELULAR

As células da linhagem B16F10 (melanoma murino), provenientes do banco de células do Rio de Janeiro - RJ, foram descongeladas do ultra-freezer -80°C. Três alíquotas foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco modified of Minimum Essential Media*) com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (estreptomicina/penicilina). Após adquirirem uma confluência de 80% na garrafa de cultura celular, as células foram soltas com o auxílio de um raspador de células *Scraper*. Após, foram centrifugadas (10 minutos a 1500 rpm) e ressuspensas em 1mL de meio de cultura (DMEM). Foram retirados 20µL da suspensão e misturado a 20µL de azul de tripan para a realização da contagem do número de células na câmara de Neubauer.

### ENSAIO DE CITOTOXICIDADE E IC 50%

As células B16F10 foram semeadas na concentração de  $1 \times 10^5$  céls/200µL (poço), em triplicata, em microplacas de 96 poços em meio de cultura DMEM completo e expostas a diferentes tratamentos do extrato hidroalcoólico nas concentrações de 10, 30, 50, 70, 80 e 100 mg/mL. No controle positivo foi adicionado peróxido de hidrogênio na concentração de 100mM. Em seguida, foram acondicionadas em estufa, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, durante 24 horas. Após 24h foi adicionado o reagente

MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5- difenil tetrazolium) seguindo a técnica descrita por Mosmann (1983). Em seguida, foi incubado por 3 horas e, após esse procedimento, a absorbância foi determinada no leitor de ELISA a 560 nm.

A concentração inibitória capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC50%) foi obtida a partir das curvas de viabilidade do ensaio de MTT, utilizando o programa GraphPad Prism 5. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e a viabilidade está expressa como porcentagem de células viáveis com ou sem o tratamento com o extrato.

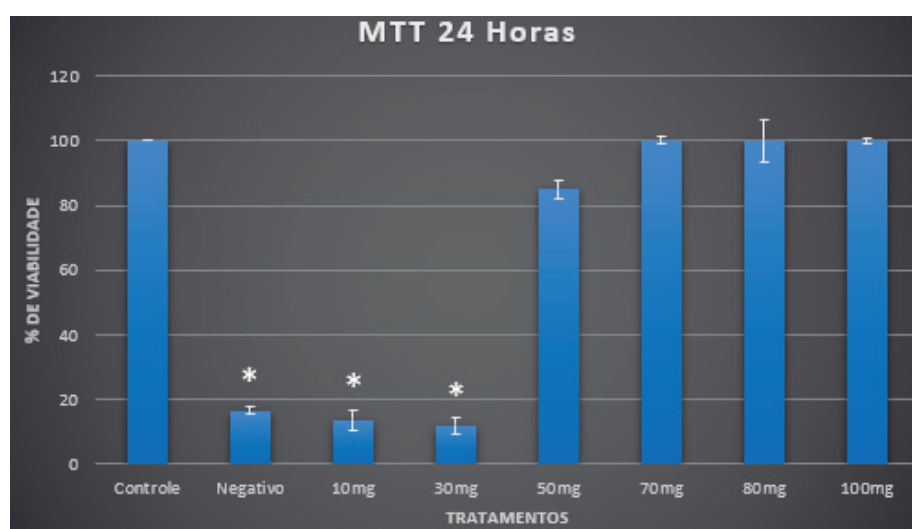
## ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram feitas utilizando o *statistical package for the social* (SPSS) versão 23.0. Para comparar os tratamentos foi realizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey. Foram considerados estatisticamente diferentes valores com  $P < 0,05^*$ .

## RESULTADOS

A viabilidade das células da linhagem B16F10, avaliadas após 24h de exposição à diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *V. breviflora* pelo método de redução do corante MTT, está apresentada na figura 1.

**Figura 1** - Viabilidade celular da linhagem de células B16F10 apresentadas em média +- desvio padrão (DP) frente a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Vassobia breviflora* (Solanaceae).



Fonte: elaborado pelos autores.

As concentrações de 10 mg/mL e 30 mg/mL do extrato hidroalcoólico de *V. breviflora*, reduziram a viabilidade celular de forma significativa em relação ao controle com células e meio de cultura, mostrando um melhor resultado biológico na concentração de 30 mg/ml.

Observa-se que as concentrações de 10 e 30 mg/mL apresentaram alta capacidade citotóxica para a linhagem de células estudadas, reduzindo a viabilidade celular em 86,4% e 88,2%, respectivamente. Essas reduções foram, inclusive, superiores em relação a redução apresentada pelo controle positivo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que foi de 83,5%. A concentração de 50 mg/mL reduziu a viabilidade celular em 14,9% enquanto as concentrações de 70, 80 e 100 mg/mL não apresentaram redução da viabilidade celular. A IC 50% (quantidade de extrato que induz metade do número de células à morte) foi calculada pelo software *GraphPad Prism* e obteve-se o resultado de 39,41 mg/mL.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliou-se uma espécie nativa que já foi estudada por outros pesquisadores, mas não no Brasil, nem com coletas de amostras provenientes da região sul. Isso torna o trabalho relevante, uma vez que a espécie possui um promissor potencial antitumoral (SAMADI et al., 2010).

Avaliar a citotoxicidade de uma planta a partir da análise de seus extratos é uma maneira amplamente utilizada para a descoberta de novos agentes antitumorais, pois os ensaios de citotoxicidade direcionam a pesquisa para substâncias que apresentam potencial de inviabilizar as células tumorais em cultura (HOLBECK, 2004). Esse ensaio é relativamente simples e permite a avaliação de um grande número de substâncias em pouco tempo (SUGGITT; BIBBY, 2005).

Os resultados obtidos no presente estudo permitem afirmar que o extrato hidroalcoólico de folhas de *V. breviflora* apresenta atividade citotóxica, uma vez que as menores concentrações já foram suficientes para a redução da viabilidade celular em mais de 80%. Já os resultados obtidos nas concentrações de 50, 70, 80 e 100 mg/mL provavelmente estão relacionados às características do extrato hidroalcoólico que se apresentou extremamente viscoso. Ao aplicar o extrato na placa, formou-se uma biomassa altamente aderente que se depositou ao fundo do poço, impossibilitando uma leitura confiável.

Estudos com a mesma espécie, que estão sendo realizados por Wergutz et al. (2016) utilizando o extrato aquoso de folhas, também evidenciaram elevada citotoxicidade em diferentes linhagens celulares. Em um experimento utilizando linhagens de carcinoma de mama, os autores constataram que o melhor resultado foi obtido utilizando-se uma concentração de 100 mg/ml do extrato, com o qual a viabilidade celular foi reduzida em 78,3%.

Em outro estudo utilizando igualmente o extrato aquoso de *V. breviflora* frente à linhagem celular B16F10, Wergutz et al. (2016) verificaram que houve redução na viabilidade celular em 59% na concentração de 10 mg/mL. Comparando-se com os dados da presente pesquisa, pode-se observar que o extrato hidroalcoólico apresenta maior eficácia que o extrato aquoso, possivelmente pela maior capacidade de extração das substâncias ativas do extrato hidroalcoólico, uma vez que a redução da viabilidade celular com o uso desse extrato foi maior do que com o uso do aquoso.

Cerca de vinte vitanolídeos já foram isolados de *V. breviflora*, porém, os estudos com a espécie evidenciam a vitaferina A como provável substância responsável atividade antitumoral (GROGAN et al., 2013; SAMADI et al., 2010).

Samadi et al. (2010) realizaram um estudo no qual testaram a atividade antiproliferativa de vitaferina A isolada do extrato hidroalcoólico obtido de partes aéreas de *V. breviflora*, em quatro linhagens de células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço (JMAR e MDA-1986, UM-SCC-2 e JHU011). Por meio de um bioensaio, utilizando a técnica de MTS (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il0-5-(3-carboximetoxefenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), os autores verificaram que a substância estudada diminuiu a viabilidade celular de todas as linhagens testadas.

## CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico de folhas de *Vassobia breviflora* apresenta potencial atividade citotóxica frente à linhagem celular B16F10. Isso foi verificado pela redução da viabilidade celular constatada neste estudo. As concentrações de 10 e 30 mg/mL apresentaram diminuição da viabilidade celular em mais de 80%, sendo maior, inclusive, do que a redução da viabilidade celular apresentada no controle positivo.

Mais estudos são necessários para a verificação de novos parâmetros e para os avanços na perspectiva de utilização de *V. breviflora* para o tratamento do câncer. Existe, também, a necessidade de mais testes com o extrato hidroalcoólico e, possivelmente, a adição a esse extrato, de uma substância com maior capacidade diluente.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo- celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética humana**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 775 p.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem. Rev.**, v. 109, n. 7, p. 3012-3042, 2009.

GROGAN, P. T. et al. Cytotoxicity of witaferin A in glioblastomas involves induction of an oxidative stress-mediated heat shock response while altering AKT/mTOR and MAPK signaling pathways. **Invest New Drugs**, v. 31, n. 3, p. 545-557, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HOLBECK, S. L. Update on nci in vitro drug screen utilities. **Eur. J Cancer**, v. 40, p. 785-793, 2004.

HUNZIKER, A. T. **The Genera of Solanaceae**. Museo Botanico-Córdoba (Argentina): A.R.G. Gantner Verlag K.-G, p. 266-268, 2001.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016. Incidência do Câncer no Brasil**. 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

MINGUZZI, S.; BARATA, L. E. S.; CORDELL, G. A. Cytotoxic derivatives of withanolides isolated from the leaves of *Acnistus arborescens*. **Quim. Nova**, v. 34, n. 2, p. 237-241, 2011.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Nat. Prod. Rep.**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

PIGATTO, A. G. S.; MENTZ, L. A.; SOARES, G. L. G. Chemotaxonomic characterization and chemical similarity of tribes/genera of the Solanoideae subfamily (Solanaceae) based on occurrence of withanolides. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 54, p. 40-47, 2014.

SAMADI, A. K. et al. Withaferin A, a Cytotoxic Steroid from *Vassobia breviflora*, Induces Apoptosis in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **J. Nat Prod.**, v. 73, n. 9, p. 1476-1481, 2010.

SMITH, S. D.; BAUM, D. A. Phylogenetics of the florally diverse Andean clade Iochrominae (Solanaceae). **Am J Bot.**, v. 93, n. 8, p. 1140-1153, 2006.



SUGGIT, M.; BIBBY, M. C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to targetdriven approaches. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 971-981, 2005.

TOMASSINI, T. C. B. et al. Gênero *physalis* uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 47-57, 2000.

WERGUTZ, J. et al. Atividade citotóxica de esporão de galo frente a linhagem celular de carcinoma de mama. In: SIMPÓSIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 20., 2016, Santa Maria. **Anais eletrônicos...** Santa Maria, 2016. Disponível em: <<https://bit.ly/2F6Tfdw>>. Acesso em: 27 maio 2017.

