

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**BRUNA LUIZA VIEGA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE *Picrasma  
crenata***

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**FRANCISCO BELTRÃO  
2018**

**BRUNA LUIZA VIEGA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE *Picrasma*  
*crenata***

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do grau em Engenharia Química pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisângela Düsman.  
Coorientadores: Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello e Prof. Dr. Douglas Junior Nicolin.

**FRANCISCO BELTRÃO**

**2018**

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**BRUNA LUIZA VIEGA**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE COMPOSTOS DE *Picrasma crenata***

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do grau em Engenharia Química pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão.

Data de aprovação: 22 de novembro de 2018.

---

**Elisângela Düsman, Professora Doutora**

**Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão**

---

**Douglas Junior Nicolin, Professor Doutor**

**Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão**

---

**Claudia Eugênia Castro Bravo, Professora Doutora**

**Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão**

A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso ou programa.

“Dedico à minha família e amigos próximos.”

## **AGRADECIMENTOS**

Diante dessa etapa de conclusão, gostaria de agradecer profundamente às pessoas ao meu redor atualmente, e também às que me acompanharam de longe sem deixarem de me apoiar, compreendendo e convivendo com a distância. Muito obrigada pela confiança que me creditaram, com certeza foi fundamental.

Agradeço a Deus por ter me abençoado até aqui, por ter passado por situações e sentimentos difíceis de lidar, mas principalmente por ter conseguido aprender com todos os obstáculos e desafios passados.

À minha família, que sem dúvida é a minha base, mesmo estando fisicamente distante a maioria do tempo. Vocês foram os responsáveis por me apoiar e me motivar em absolutamente todos os momentos, proporcionando essa caminhada de aprendizados pessoais e profissionais até então.

À minha orientadora e meus coorientadores pelo profissionalismo, conhecimento, interesse e também paciência envolvidos nesse processo. Os meus mais sinceros agradecimentos para vocês que tanto fizeram parte desse projeto, me auxiliando nessa etapa tão importante pra mim, como profissional e também como aprendiz da vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Panis, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), pela disponibilidade e atenção durante os experimentos realizados.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

(CHAPLIN, [19--] apud MENEZES, 2013).

## RESUMO

As plantas medicinais são constituídas de várias substâncias que podem ser extraídas e ter uso terapêutico e/ou na medicina alternativa. O crescente número de diagnósticos de doenças crônicas, como o câncer e, conseqüentemente, o elevado índice de mortes, estimulou a busca pela cura e/ou por novos tratamentos menos agressivos. Assim, o objetivo do presente estudo foi descobrir a atividade citotóxica/antitumoral do extrato bruto do Pau Tenente e de seus compostos isolados, quassina e paraína, em cultura de células tumorais hepáticas de rato (HTC), e obter ajustes de polinômios que descrevam os resultados através de testes com equações empíricas. O ensaio de citotoxicidade/atividade antitumoral do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide] foi realizado expondo as células HTC por 24, 48 e 72 horas aos tratamentos: controle negativo (100 µL meio de cultura); controle positivo (tratamento com 500 µM do agente citotóxico metil metano sulfonato); controle solvente (25 µL de DMSO (dimetilsulfóxido)/mL meio de cultura para a quassina e 20 µL de DMSO/mL de meio de cultura para a paraína); e concentrações de extrato bruto do Pau Tenente (5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg/mL de meio de cultura) e dos compostos quassina e paraína (1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL de meio de cultura). Após o período de exposição dos tratamentos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 492 nm para determinar a atividade citotóxica dos compostos estudados. Os resultados das médias das absorbâncias obtidas mostram que o extrato bruto apresentou baixa citotoxicidade para as células HTC, em todas as concentrações testadas. Para a quassina, as concentrações de 80 e 100 µg/mL foram citotóxicas, após 72 horas de tratamento. Já o teste com a paraína mostrou que as concentrações de 1, 5, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL, no tempo de 72 horas, foram citotóxicas, revelando uma nova atividade para este composto. Dessa forma, nas condições experimentais, os resultados comprovaram a atividade antitumoral da quassina e da paraína, agregando-se um importante valor social e econômico a esses compostos, podendo também ter aplicação em pesquisas futuras e na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Quassina. Paraína. HTC. MTT. Antitumoral.

## ABSTRACT

Medicinal plants are made up of various substances that can be extracted and have therapeutic use and/or alternative medicine. The increasing number of diagnoses of chronic diseases, such as cancer and, consequently, the high death rate, stimulated the search for cure and/or for new and less aggressive treatments. Thus, the objective of the present study was to discover the cytotoxic/antitumor activity of the crude extract of Pau Tenente and its isolated compounds, quassin and parain, in culture of rat hepatic tumor cells (HTC), and to obtain adjustments of polynomials that describe the results using empirical equations. The cytotoxicity/antitumor activity of MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] was performed by exposing the HTC cells for 24, 48 and 72 hours to treatments: negative control (100  $\mu$ L culture medium); positive control (treatment with 500  $\mu$ M cytotoxic agent methyl methane sulfonate); solvent control (25  $\mu$ L DMSO (dimethylsulfoxide)/mL culture medium for quassin and 20  $\mu$ L DMSO/mL culture medium for parain); and treatments with the crude extract of Pau Tenente (5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 and 1000  $\mu$ g/mL culture medium) and the quassin and parain compounds (1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 and 100  $\mu$ g/mL culture medium). After the exposure period of the treatments, the reading was performed in a spectrophotometer at 492 nm to determine the cytotoxic activity of the compounds studied. The results of the obtained absorbance averages show that the crude extract showed low cytotoxicity for the HTC cells at all concentrations tested. For quassin, concentrations of 80 and 100  $\mu$ g/mL were cytotoxic after 72 hours of treatment. On the other hand, the test with parain showed that the concentrations of 1, 5, 20, 40, 60, 80 and 100  $\mu$ g/mL, at 72 hours, were cytotoxic, revealing a new activity for this compound. Thus, in the experimental conditions, the results proved the antitumor activity of quassin and parain, adding an important social and economic value to these compounds, and may also be applied in future research and in the pharmaceutical industry.

Key words: Quassin. Parain. HTC. MTT. Antitumor.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Picrasma crenata</i>	15
Figura 2 – <i>Quassia amara</i>	16
Figura 3 – Estrutura química da quassina	16
Figura 4 – Estrutura química da paraína	17
Figura 5 – Transformação do MTT em formazan	21
Figura 6 – Células metabolizadoras cancerosas obtidas de fígado de <i>Rattus norvegicus</i> (HTC)	22
Figura 7 – Placas de 24, 48 e 72 horas tratadas com o extrato bruto de Pau Tenente	25
Figura 8 – Placas de 24, 48 e 72 horas tratadas com a quassina	25
Figura 9 – Placas de 24, 48 e 72 horas tratadas com a paraína	25
Figura 10 - Absorbâncias médias e desvios-padrões de células HTC tratadas com as diferentes concentrações do extrato bruto de Pau Tenente, incubadas por 24, 48 e 72 horas	27
Figura 11 – Curva ajustada para dados de absorbância versus concentração versus tempo, com extrato bruto de Pau Tenente	29
Figura 12 – Absorbâncias médias e desvios-padrões de células HTC tratadas com as diferentes concentrações de quassina, incubadas por 24, 48 e 72 horas	30
Figura 13 – Curva ajustada para dados de absorbância versus concentração versus tempo, com quassina isolada de Pau Tenente	32
Figura 14 – Absorbâncias médias e desvios-padrões de células HTC tratadas com as diferentes concentrações de paraína, incubadas por 24, 48 e 72 horas	34
Figura 15 – Curva ajustada para dados de absorbância versus concentração versus tempo, com paraína isolada de Pau Tenente	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentuais de viabilidade de células HTC (VC) tratadas com as diferentes concentrações do extrato bruto de Pau Tenente, incubadas por 24, 48 e 72 horas	28
Tabela 2 – Coeficientes da equação da curva ajustada para o experimento com o extrato bruto do Pau Tenente	30
Tabela 3 – Percentuais de viabilidade de células HTC (VC) tratadas com as diferentes concentrações da quassina, incubadas por 24, 48 e 72 horas	31
Tabela 4 – Coeficientes da equação da curva ajustada para o experimento com a quassina do Pau Tenente	33
Tabela 5 – Percentuais de viabilidade de células HTC (VC) tratadas com as diferentes concentrações da paraína, incubadas por 24, 48 e 72 horas	34
Tabela 6 – Coeficientes da equação da curva ajustada para o experimento com paraína do Pau Tenente	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>14</b>
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	14
3.1.1 Pau Tenente	15
3.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO	17
3.3 CÂNCER	18
3.4 PLANTAS MEDICINAIS COMO ANTITUMORAIS	19
3.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL	20
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>23</b>
4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA/ANTITUMORAL	23
4.1.1 Linhagem Celular	23
4.1.2 Solução Tratamento	23
4.1.3 Teste de Citotoxicidade/Atividade Antitumoral do MTT	23
4.1.4 Rendimento de Extração	25
4.2 AJUSTE DE POLINÔMIOS A PARTIR DOS DADOS	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
5.1 EXTRATO BRUTO	27
5.2 QUASSINA	30
5.3 PARAÍNA	33
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são constituídas de várias substâncias que podem ser extraídas e ter uso terapêutico e/ou na medicina alternativa. Em diversos grupos étnicos e comunidades, elas são a única solução terapêutica disponível e acessível (GOMES; FIRMO; VILANOVA, 2014).

A técnica de extração, em especial de compostos de plantas medicinais, é muito utilizada industrialmente, tanto para a separação quanto para a purificação de compostos orgânicos, tendo aplicação em diversas áreas, como ambiental, farmacêutica, petroquímica, dentre outras (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). O método de extração está diretamente ligado com a atividade biológica resultante das substâncias extraídas. Além disso, o solvente aplicado no processo e a parte da planta utilizada também podem interferir na atividade biológica desejada (FERNAND, 2003).

O Pau Tenente (*Picrasma crenata*) é uma planta medicinal descrita popularmente como febrífuga, antissifilítica, antimalárica, tônica e inseticida (DEBENEDETTI et al., 2002). Apers et al. (2002), Roldán et al. (2007) e Novello et al. (2008) descreveram, respectivamente, atividade antitumoral, possível atividade genotóxica e baixa toxicidade do extrato de *Picrasma crenata*. Alguns quassinóides, que são substâncias encontradas no Pau Tenente, já apresentaram atividade antitumoral (MORITA et al., 1990; VON BUEREN et al., 2007), anti-úlceras (TADA et al., 1991) e apoptótica (ROSATI et al., 2004).

O reconhecimento da eficiência existente no uso de substâncias encontradas em plantas medicinais pode ser considerado um motivo para a busca cada vez maior dessa variedade de tratamento. Outras razões podem ser a insatisfação com os tratamentos convencionais, em conjunto com efeitos colaterais causados por mau uso de medicações sintéticas desses tratamentos, bem como da inacessibilidade de uma significativa parcela da sociedade a esses medicamentos (GOMES; FIRMO; VILANOVA, 2014).

Em especial, o crescente número de diagnósticos de doenças crônicas, como o câncer e, conseqüentemente, o elevado índice de mortalidade, estimulou a busca pela cura e por novos tratamentos menos agressivos. Dessa forma, várias pesquisas têm objetivado comprovar e determinar as diversas atividades biológicas, principalmente a atividade citotóxica/antitumoral, dos compostos presentes em

plantas medicinais, já que os resultados são de grande interesse para a população em geral e para a indústria farmacêutica (GOMES et al., 2013).

A citotoxicidade avalia o quão nocivo o composto estudado pode ser, baseando-se no comportamento (morte ou não) de células vivas na presença de concentrações de determinado composto. Existem diversas metodologias para avaliação de atividade citotóxica, e sua escolha depende principalmente do produto a ser testado (BIANCHI, 2008).

Um teste citotóxico reconhecido internacionalmente é o que avalia a viabilidade celular de células *Hepatoma Tissue Culture* (HTC), que são células cancerosas advindas do fígado de ratos (*Rattus norvegicus*) (OLIVEIRA et al., 2006). Elas são células metabolizadoras e, por consequência disso, são muito aplicadas em experimentos *in vitro*, cujo intuito é avaliar a reação do metabolismo do fígado na toxicidade de determinados compostos (BIANCHI, 2008). A utilização de células como essas possibilitam a comparação do comportamento delas com um possível comportamento em humanos, devido à semelhança entre as células (BIANCHI, 2008).

Levando-se em consideração a inexistência de estudos com relação às atividades antitumorais do Pau Tenente ou de seus compostos isolados quassina e paraína, frente às células tumorais hepáticas de ratos, é importante avaliar esta atividade, a fim de que essa planta possa ser utilizada para tratar doenças do gênero, podendo até garantir uma maior segurança de uso. Além disso, o Pau Tenente possui significantes vantagens, como ser abundante e acessível financeiramente. Partindo dessa avaliação e, determinando tais atividades biológicas, com base no comportamento de células cancerosas de ratos, pode-se agregar um importante valor social e econômico a essa planta e seus compostos.

Assim, o objetivo do presente projeto foi investigar a ação do Pau Tenente e de seus compostos isolados quassina e paraína como agentes antitumorais frente às células HTC. Além disso, equações empíricas que correlacionam estes dados contribuirão para a sua interpretação e possibilitarão identificar a melhor forma de tratamento e/ou combate deste tipo de câncer hepático.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade citotóxica/antitumoral do extrato bruto do Pau Tenente e de seus compostos isolados, quassina e paraína, em cultura de células tumorais de fígado de rato, *in vitro*, e obter ajustes de polinômios que descrevam essa atividade, a fim de identificar a melhor forma de tratamento e/ou combate deste câncer.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) avaliar e comparar a atividade citotóxica/antitumoral do extrato bruto de Pau Tenente, da quassina e da paraína, em cultura de células HTC tratadas por 24, 48 e 72 horas;
- b) analisar a eficiência, em termos de citotoxicidade, do extrato bruto e dos compostos isolados, determinando a melhor forma e concentração do Pau Tenente como anticâncer;
- c) comparar o rendimento de extração do extrato bruto e dos compostos isolados com a atividade citotóxica/antitumoral, a fim de analisar sua aplicação e eficiência na indústria;
- d) testar equações empíricas que descrevam o comportamento das células HTC perante cada composto testado, nas diferentes concentrações e tempos de tratamentos avaliados.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são constituídas de substâncias que podem ter aplicação terapêutica e/ou na medicina alternativa (GOMES; FIRMO; VILANOVA, 2014). Elas são utilizadas principalmente com base em informações muito antigas e tradicionais, por meio de observação e experimentação (ALVARENGA et al., 2017) e, em diversos grupos étnicos e comunidades pobres, são a única solução terapêutica disponível e acessível para a maioria. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a medicina tradicional é buscada por pelo menos 80% da população mundial pra suprir necessidades médicas básicas (GOMES; FIRMO; VILANOVA, 2014).

A experimentação e comprovação de resultado eficaz das plantas medicinais mantêm e acumulam as informações terapêuticas já conhecidas e descobertas, ao longo dos anos (GOMES; FIRMO; VILANOVA, 2014).

Pela enorme diversidade da sua flora, o Brasil mostra um grande interesse da população na adesão de tratamentos naturais (FERRAZ et al., 2010). Ainda no Brasil, somente 8% de todas as 60 mil espécies de plantas catalogadas foram alvos de pesquisas relacionadas aos compostos bioativos e quase 2% referem-se a suas propriedades medicinais (BARROS, 2010).

O reconhecimento da eficiência existente do uso de substâncias encontradas em plantas medicinais pode ser considerado um motivo para a busca cada vez maior dessa variedade de tratamento. Outras razões podem ser a insatisfação com tratamentos convencionais, em conjunto com efeitos provocados pelo próprio uso incorreto de drogas sintéticas indicadas nesses tratamentos, bem como, da inacessibilidade de uma significativa parcela da sociedade a esses medicamentos (GOMES; FIRMO; VILANOVA, 2014).

O conhecimento popular desperta um interesse de cunho científico e a curiosidade de pesquisadores e da própria população, no intuito de estudar e comprovar propriedades terapêuticas de plantas antes desconhecidas (GOMES; FIRMO; VILANOVA, 2014).

Muitos fármacos vendidos são originados de compostos naturais, desencadeando um dos principais motivos para se analisar e caracterizar extratos

vegetais. Com o avanço da tecnologia, métodos químicos modernos garantem a acessibilidade às moléculas bioativas, tornando ainda mais viável seu estudo como protótipo para a criação de formulações de medicamentos (BARROS, 2010).

### 3.1.1 Pau Tenente

O Pau Tenente, representado na Figura 1 e cujo nome científico é *Picrasma crenata*, é uma planta medicinal descrita popularmente como febrífuga (DEBENEDETTI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2015); antimalárica (LANG'AT et al., 1998; DEBENEDETTI et al., 2002); antissifilítica, tônica, inseticida (DEBENEDETTI et al., 2002); hipoglicêmica (RAJASEKARAN; SIVAGNANAM; SUBRAMANIAN, 2005; GOMES; FIRMO; VILANOVA, 2014); antitumoral (APERS et al., 2002); emagrecedora (TEIXEIRA et al., 2014); antiespasmódica (OLIVEIRA et al., 2015); utilizada contra a *Diabetes mellitus* com indicação terapêutica empírica (ALVARENGA et al., 2017) e no tratamento do vitiligo (MONTEIRO et al., 2002). O estudo de Novello et al. (2008) mostrou baixa toxicidade do extrato hidroalcoólico de *P. crenata* em ratos, e comprovou seu potencial positivo como hipoglicêmico e anti-úlceras.

Figura 1 – *Picrasma crenata*



Fonte: Lopes (2012).

*P. crenata* pode ser encontrada nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia (PIRANI, 1997). Ela também está presente na região subtropical úmida de Misiones, na Argentina, e é confundida com outras espécies de madeira amarga, como a *Quassia amara* (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 2005). No Brasil, a *Q. amara*, representada na Figura 2, é conhecida como falso quinino e cresce na região úmida amazônica de Belém e



Pará, e já a *P. crenata* é também conhecida como *Aeschron crenata* e cresce também na parte selvagem da Mata Atlântica (OCAMPO; BALICK, 2010).

Figura 2 - *Quassia amara*

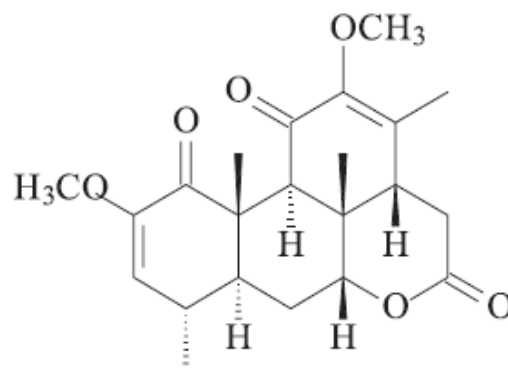


Fonte: Barros (2010).

*P. crenata* e *Q. amara* são constituídas por quassinóides, compostos que possuem vasta faixa de atividade biológica (ALMEIDA et al., 2007). Alguns deles já apresentaram atividades antitumorais (MORITA et al., 1990; VON BUEREN et al., 2007), anti-úlceras (TADA et al., 1991) e apoptótica (ROSATI et al., 2004).

A quassina (Figura 3), por exemplo, encontrada comercialmente, é na maioria das vezes extraída de *P. excelsa* ou *Q. amara*, consistindo numa mistura de quassina e neoquassina (SREENATH; JAGADISHCHANDRA; BAJAJ, 1994). É considerada um princípio ativo, classificada como um quassinóide, de um sabor característico e amargo, atribuídos às suas propriedades medicinais (ALMEIDA et al., 2007). Por isso, a quassina pode ser utilizada como agente amargo para alimentos e bebidas (FERNAND, 2003). No entanto, o estudo farmacológico de Raji e Bolarinwa (1997) revelou que ingestão oral do composto quassina em ratos machos provocou a infertilidade nos animais.

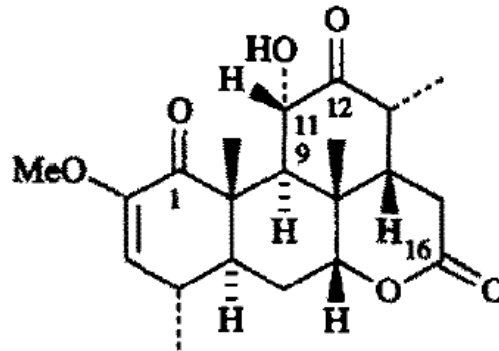
Figura 3 – Estrutura química da quassina



Fonte: Almeida et al. (2007).

A paraína (Figura 4) é outro princípio ativo quassinóide encontrado no extrato de *Q. amara* (HUSAIN et al., 2011), e também isolado de *Aeschrion crenata*, que é uma sinonímia de *P. crenata*, correspondendo então à mesma planta (BARBETTI et al., 1993).

Figura 4 – Estrutura química da paraína



Fonte: Barbetti et al. (1993).

### 3.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

A técnica de extração de compostos de plantas medicinais é amplamente utilizada na indústria em geral, tanto na separação quanto na purificação de compostos orgânicos, englobando áreas como a ambiental, farmacêutica, petroquímica, dentre outras. O processo pode garantir a análise dos componentes extraídos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A atividade do composto da planta sofre a influência da metodologia empregada na extração, assim como da parte da planta e do tipo de solvente escolhidos (MATEUS, 2012). Em Fernand (2003), métodos de extração foram otimizados, com intuito de maximizar a recuperação de metabólitos secundários nos extratos brutos de *Phyllanthus amarus* e *Q. amara*. Examinou-se a influência de diversos solventes, escolhendo-se a fase móvel mais adequada para os extratos vegetais, e verificando-se o método de detecção mais apropriado.

De acordo com Ferraz et al. (2010), o processo de extração, como um todo, pode ser aplicado também na retirada de óleos essenciais, e no preparo de extratos de plantas.

Desse modo, é fundamental o desenvolvimento de métodos de extração adequados e específicos para obter extratos de plantas distintas com o maior número possível de compostos ativos (FERNAND, 2003), pois podem constituir

novos fármacos para o tratamento do câncer e de outras enfermidades que atingem a população mundial.

### 3.3 CÂNCER

O câncer é uma doença crônica e genética causada por anomalias no ácido desoxirribonucléico (DNA) e é uma das mais predominantes mundialmente, considerando essa categoria de patologia. Em termos gerais, as células cancerosas são células que se dividem incessantemente e se dispersam nos tecidos próximos. As células em seu estado normal dividem-se conforme a necessidade do próprio corpo, até morrerem por envelhecerem ou ficarem deterioradas e, então, novas células substituem o seu lugar. As células cancerosas, por outro lado, se desenvolvem cada vez mais irregulares, com sobrevivência das células velhas e a formação de novas células, mesmo que desnecessárias. Essas células extras se dividem continuamente, devido à sua capacidade de ignorar os sinais de apoptose, a morte celular programada, podendo então acarretar na formação de tumores (NCI, 2015), que se tiverem a capacidade de originar metástases serão malignos.

Em 2008, 21% dos óbitos mundiais ocorreram em consequência do câncer, impactando majoritariamente os países de médio e baixo desenvolvimentos. Em 2012, aproximadamente 14,1 milhões de novos casos de câncer foram registrados no mundo e, 8,2 milhões resultaram em óbitos. As taxas intermediárias de incidência do câncer estão localizadas na América do Sul e Central, no Leste Europeu e, na maioria, do Sudeste Asiático. Nos países de médio e baixo desenvolvimentos, os casos de câncer diretamente ligados com infecções (colo do útero, estômago, esôfago e fígado) são os mais relatados (INCA, 2018a).

Para o Brasil, entre 2018 e 2019, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para cada ano. Essa estimativa prevê que, por região geográfica, as Regiões Sul e Sudeste serão afetadas com 70% dos novos casos (INCA, 2018c).

O câncer no fígado, também chamado de carcinoma hepatocelular (CHC), é oriundo dos hepatócitos, que são as principais células do órgão, e pode ter influência de agentes externos, como a exorbitante multiplicação de células e o vírus da hepatite. Manifesta-se da mutação dos genes de uma única célula, fazendo com que ela se reproduza descontroladamente. O CHC é um dos cânceres mais violentos, tendo uma alta percentagem de casos fatais. Mesmo diagnosticado precocemente, o

paciente não tem muitos tratamentos disponíveis e, os existentes, são pouco eficientes (BARBEZAN, 2017; GOMES et al., 2013). O câncer hepático está em quarto lugar entre os cânceres mais comuns, e em terceiro lugar entre os cânceres com maior causa de morte mundialmente (NCI, 2018a). No Brasil, em 2013, o número de mortes causadas pelo câncer hepático, foi de 5.012 homens (57,14%) e 3.759 mulheres (42,86%), totalizando 8.771 mortes (INCA, 2018b).

As dificuldades nos tratamentos que a maioria dos pacientes com tumores malignos sofrem são o desenvolvimento da resistência do medicamento contra o câncer, a falta de sensibilidade dos tumores com relação à terapia empregada e, ainda, preocupantes efeitos colaterais (VAN UDEN; PRAS; WOERDENBAG, 1994). Os efeitos colaterais geralmente afetam tecidos ou órgãos saudáveis, além de sintomas como anemias, perda de apetite, delírio, fadiga, queda de cabelo, náuseas e vômitos, dentre outros (NCI, 2018b).

Os medicamentos empregados em tratamentos contra o câncer, na maioria das vezes prejudicam o DNA ou impedem a sua replicação. O uso de fármacos que somente inibam o crescimento do tumor através da ação direta na angiogênese, e não atinjam as células cancerosas em si, vem sendo estudado, assim como medicações capazes de inativar as enzimas proteinases, originadas pelo tumor e atuantes na diminuição do crescimento celular e desenvolvimento do câncer (SIMONETTI, 2004). Com isso, nota-se que é preciso descobrir fármacos mais eficientes de modo a suprir esse problema (WIDHOLM; KUMLEHN; NAGATA, 1994).

### 3.4 PLANTAS MEDICINAIS COMO ANTITUMORAIS

Para descobrir potenciais de plantas e suas substâncias para aplicação no tratamento de doenças, como o câncer, é necessária uma profunda pesquisa destes efeitos, sendo que a técnica de extração dos compostos das plantas é fundamental, assim como sua metodologia aplicada (FERNAND, 2003).

Mais de mil espécies de plantas possuem propriedades antitumorais expressivas e cerca de 50% dos anticancerígenos empregados têm origem natural (FIASCHETTI et al., 2011). O estudo da atividade antitumoral de plantas é fundamental para a busca e comprovação da presença de compostos bioativos, que podem ter aplicações terapêuticas e ainda fazer parte da composição de fármacos (SILVA, 2008).

Diversos estudos relatam influência de plantas e seus compostos no processo de desenvolvimento do câncer. Como exemplo de quassinóides, originados de plantas medicinais, pode-se destacar: o bruceantina com atividade antileucêmica (POLONSKY, 1985); a cedronolactona A com atividade *in vitro* contra leucemia linfocítica P-388 (OZEKI et al., 1998); o bruceanol D com citotoxicidade *in vitro* em célula cancerosa nasofaríngeal (IMAMURA et al., 1993); o euricomalactona com atividade contra câncer de pulmão e de mama (KUO et al., 2004); e os bruceosídeos D, E e F com atividade contra leucemia, melanoma, câncer ovariano e de cólon (OHNISHI et al., 1995).

A suplementação dietética nutrida de moléculas bioativas, provenientes da purificação de extratos naturais, é recomendada para a prevenção do câncer e doenças cardíacas, além de repor hormônios na fase da menopausa. Quando ingeridas, ocorre a absorção no intestino, metabolização no fígado e, então, essas moléculas podem exercer suas atividades de controle da proliferação e diferenciação celular, inibição da angiogênese (formação dos vasos sanguíneos) e metástase e indução de apoptose (JOSIANE et al., 2012).

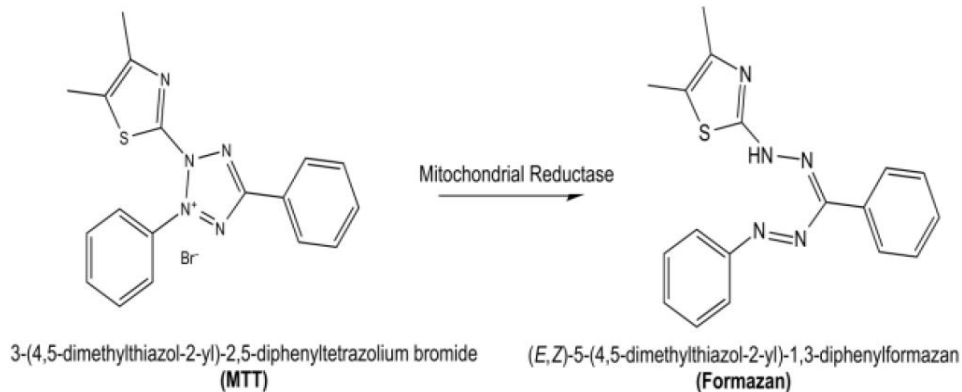
### 3.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL

O principal objetivo de ensaios de citotoxicidade, ou viabilidade celular, é testar a atividade citotóxica de substâncias, materiais e soluções em variações celulares distintas (MOSMANN, 1983). Essa viabilidade pode ser observada pela inserção de corantes vitais, já que promovem a distinção entre células mortas, inativas e vivas, através da coloração da cultura. Existem diversas metodologias para avaliação de atividade citotóxicas, e sua escolha depende principalmente do produto a ser testado (BIANCHI, 2008).

O teste do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide] avalia a viabilidade celular e é caracterizada por ser uma metodologia colorimétrica. As desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente viáveis, na presença do MTT, clivam o anel de tetrazólio, convertendo a antiga coloração amarela para uma azul escura, representada na Figura 5. Esse composto de coloração azul escura é chamado de formazan [E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan], que são cristais insolúveis em soluções aquosas e que

demonstram o estado funcional da cadeia respiratória, indicando, assim, a quantidade de células vivas (MOSMANN, 1983).

Figura 5 – Transformação do MTT em formazan



Fonte: Mosmann (1983).

As culturas de células foram empregadas no intuito de padronizar testes de toxicidade *in vitro*. Essa técnica envolve a adição direta ou indireta do composto a ser testado, em uma cultura celular. Sendo assim, constata-se a modificação ou não do meio e, notam-se relevantes informações sobre o mecanismo pelo qual as modificações ocorrem (BIANCHI, 2008).

Algumas vantagens dos métodos *in vitro* podem ser citadas quanto aos *in vivo*, como: os resultados significativos são obtidos de maneira mais rápida e fácil; o número de variáveis experimentais pode ser limitado, testes com cultura de células são sensíveis, rápidos, reproduzíveis e de baixo custo, tornando-os muito atraentes (ROGERO et al., 2003).

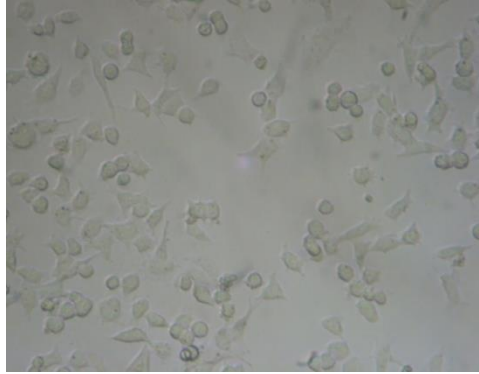
O teste de citotoxicidade *in vitro* é muito utilizado na análise de biocompatibilidade de materiais biomédicos, já que só mediante comprovação de não toxicidade é que os materiais podem ser encaminhados para os testes em animais de laboratório (BIANCHI, 2008).

A utilização de células de animais mamíferos possui uma grande vantagem, que é a possibilidade de comparação do comportamento delas com um possível comportamento em humanos. Isso pode ser explicado graças à semelhança entre as células e, assim, pode ser aplicado em pesquisas sobre doenças crônicas, como o câncer (BIANCHI, 2008).

As células HTC (*Hepatoma Tissue Culture*) (Figura 6) são células cancerosas advindas do fígado de ratos (*Rattus norvegicus*), e são sistemas simples e sensíveis para testes *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, são células

metabolizadoras, e por consequência, são muito aplicadas em experimentos *in vitro* cujo intuito é avaliar a reação do metabolismo do fígado na toxicidade de determinados compostos (BIANCHI, 2008).

Figura 6 – Células metabolizadoras cancerosas obtidas de fígado de *Rattus norvegicus* (HTC)



Fonte: Düsman (2014).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA/ANTITUMORAL

#### 4.1.1 Linhagem Celular

As células derivadas de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), obtidos junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro-RJ-Brasil, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com 10% de soro bovino fetal e incubadas em estufa do tipo BOD a 37 °C. O ciclo celular destas células é de aproximadamente 24 horas.

#### 4.1.2 Solução Tratamento

Foi utilizado como solução tratamento o extrato bruto etanólico (80%) de Pau Tenente e os compostos quassina e paraína, isolados desta planta. Estes foram gentilmente fornecidos pelo Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello. Todas as concentrações testadas foram definidas após testes-piloto.

O extrato bruto de Pau Tenente (liofilizado) foi dissolvido em meio de cultura DMEM e então utilizado para o preparo das concentrações tratamento (5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg/mL de meio de cultura).

A quassina e a paraína, depois de liofilizadas, foram dissolvidas com meio de cultura acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração final de 25 µL de DMSO/mL de meio de cultura para a quassina e, 20 µL de DMSO/mL de meio de cultura para a paraína. Após, esta solução foi utilizada para o preparo das concentrações tratamento da quassina e paraína (1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL de meio de cultura).

#### 4.1.3 Teste de Citotoxicidade/Atividade Antitumoral do MTT

O ensaio de citotoxicidade/atividade antitumoral do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide] seguiu o protocolo sugerido por Mosmann (1983). Utilizaram-se placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada



poço foram semeadas  $2,0 \times 10^4$  células HTC. Após 24 horas o meio de cultura de cada poço foi descartado, através do uso de micropipeta multicanal, e foram adicionados 100  $\mu$ L de meio novo com os tratamentos: controle negativo (CO-) (meio de cultura); controle positivo (CO+) (tratamento com o agente citotóxico metil metano sulfonato (MMS) (500  $\mu$ M)); controle solvente (CS) (25  $\mu$ L de DMSO/mL de meio de cultura para a quassina e 20  $\mu$ L de DMSO/mL de meio de cultura para a paraína); e tratamentos com as diferentes concentrações do extrato bruto do Pau Tenente e dos compostos quassina e paraína.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após este tempo, substituiu-se o meio de cultura com os tratamentos por 100  $\mu$ L de meio livre de soro, acrescido de MTT (0,167 mg/mL). A placa foi incubada por mais 4 horas e, na sequência, descartou-se o meio contendo MTT, através do uso de micropipeta multicanal, e adicionou-se aos poços 100  $\mu$ L de DMSO, para diluição dos cristais de formazan formados (Figuras 7, 8 e 9).

A leitura foi realizada em leitora de microplacas a 492 nm e os dados foram expressos pelas médias das absorvâncias obtidas nas três repetições biológicas. A análise estatística foi realizada por análise de variância (one way ANOVA), seguida pelos testes de Dunnet ( $\alpha=0,05$ ,  $p<0,05$ ,  $n=3$ ), para comparação das absorvâncias médias do controle negativo com as absorvâncias de cada grupo tratado, em cada tempo de tratamento, e Tukey ( $\alpha=0,05$ ,  $p<0,05$ ,  $n=3$ ), para comparação das absorvâncias médias entre as concentrações de cada tratamento, em cada tempo, entre cada concentração dentro dos diferentes tempos testados e entre as mesmas concentrações, nos mesmos tempos, para a quassina e paraína, pelo Programa GraphPad InStat.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados através da Equação 1.

$$VC = \left( \frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) \times 100 \quad (1)$$

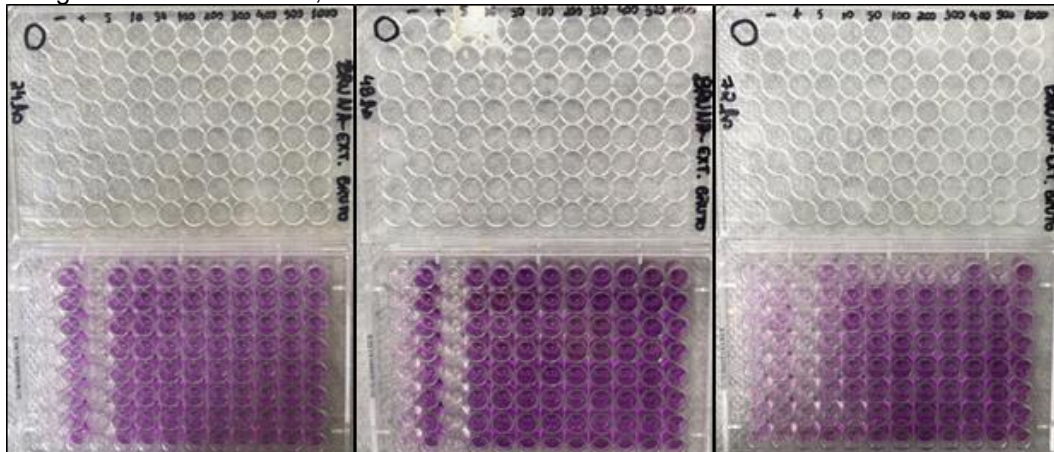
Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

$ABS_T$  = Absorvância do tratamento;

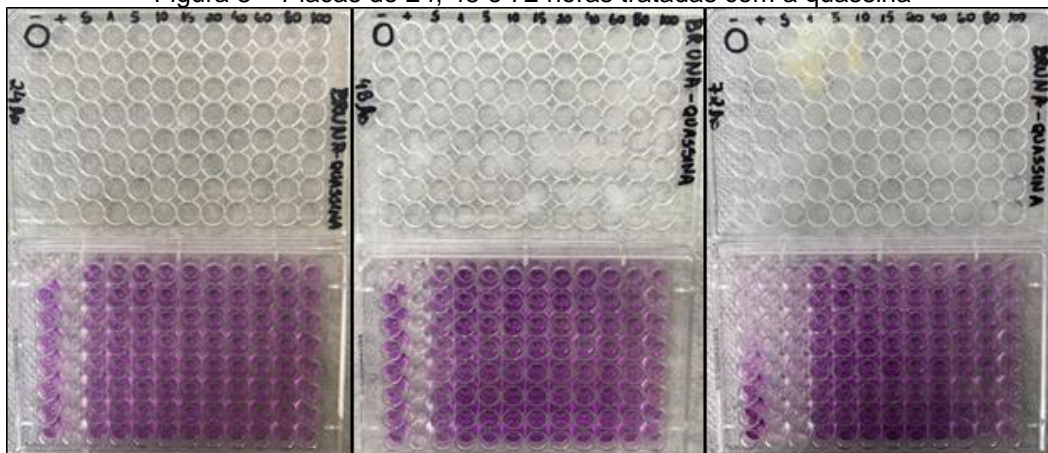
$ABS_{CO-}$  = Absorvância do controle negativo.

Figura 7 – Placas de 24, 48 e 72 horas tratadas com o extrato bruto de Pau Tenente



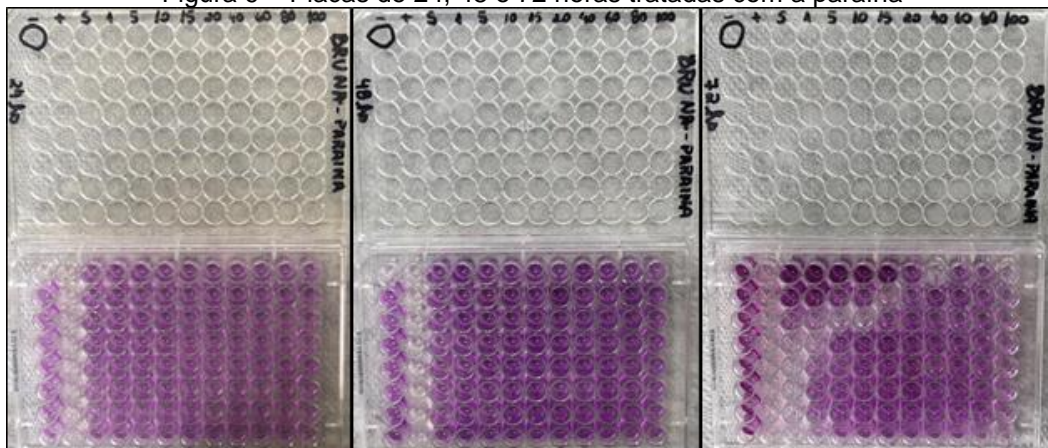
Fonte: Autoria própria (2018).

Figura 8 – Placas de 24, 48 e 72 horas tratadas com a quassina



Fonte: Autoria própria (2018).

Figura 9 – Placas de 24, 48 e 72 horas tratadas com a paraína



Fonte: Autoria própria (2018).

#### 4.1.4 Rendimento de Extração

A partir dos dados da extração foram calculados os rendimentos deste processo para o extrato bruto e dos compostos isolados, quassina e paraína. Com

isso, pode-se comparar a eficiência citotóxica/antitumoral e de obtenção dos extratos ou compostos, para aplicação na indústria farmacêutica.

#### 4.2 AJUSTE DE POLINÔMIOS A PARTIR DOS DADOS

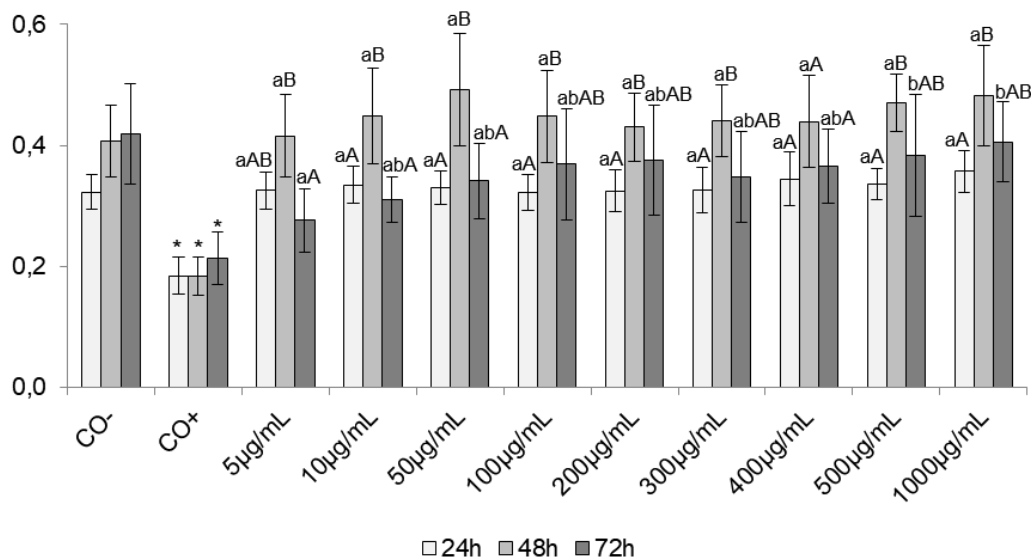
Os polinômios ajustados através de equações empíricas, que descreveram o comportamento das células HTC para cada composto testado, foram construídos a partir dos dados experimentalmente obtidos e foram válidos somente dentro das faixas de concentração e tempo empregadas. Os coeficientes de cada equação foram conseguidos através do *software* Scilab 6.0.1, pelo comando “coeff”, com um intervalo de confiança de 95%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRATO BRUTO

Os dados da Figura 10 apresentam os valores médios das absorvâncias e desvios-padrões obtidos com as células HTC tratadas por 24, 48 e 72 horas com o extrato bruto de Pau Tenente. A análise indica que nenhuma concentração do extrato bruto foi estatisticamente diferente do controle negativo, em nenhum dos tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas), mostrando que nenhuma concentração, em nenhum dos tempos, apresentou efeito citotóxico e, assim, atividade antitumoral frente às células HTC.

Figura 10 – Absorvâncias médias e desvios-padrões de células HTC tratadas com as diferentes concentrações do extrato bruto de Pau Tenente, incubadas por 24, 48 e 72 horas



Fonte: Autoria própria (2018).

Legenda: CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; \*: Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet,  $p < 0,05$ ).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, na comparação entre as concentrações no mesmo tempo de avaliação, e maiúsculas, dentro da mesma concentração nos diferentes tempos de avaliação (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Esses resultados corroboram com os encontrados por Novello et al. (2008), que também confirmaram baixa atividade tóxica do extrato hidroalcoólico de *P. crenata*, *in vivo*. Neste experimento, as massas do corpo, pulmões, fígado e coração de ratos tratados via intravenosa com 2500 e 5000 mg do extrato/kg permaneceram inalteradas. O estudo de Toma et al. (2002) também demonstrou ausência de sinais de toxicidade e/ou morte de camundongos perante a administração via oral (5000

mg/kg) e intraperitoneal (1000 mg/kg) de extratos etanólico 70%, etanólico 100%, diclorometânico e hexânico de *Q. amara*, planta que possui propriedades semelhantes à estudada no presente estudo (*P. crenata*) e que, por sua vez, não apresentou efeito citotóxico às células HTC.

As viabilidades celulares (Tabela 1) apresentadas pelos grupos tratados com extrato bruto de Pau Tenente foram, inclusive, maiores que 99,80% (24 horas), 102,10% (48 horas) e 65,86% (72 horas). Os menores valores foram no tempo de 72 horas, sendo que, neste caso, as absorvâncias das maiores concentrações (500 e 1000 µg/mL) foram estatisticamente diferentes da concentração de 5 µg/mL, que apresentou baixa absorvância média e a menor viabilidade celular de todos os tratamentos realizados (65,86%). De forma geral, pode-se notar uma leve proliferação de células HTC no tempo de 48 horas, comprovada pelas suas absorvâncias médias que foram estatisticamente maiores e diferentes das obtidas nos tempos de 24 horas (concentrações de 10, 50, 100, 200, 300, 500 e 1000 µg/mL) e 72 horas (5, 10, 50 µg/mL), pelo teste de Tukey.

Tabela 1 – Percentuais de viabilidade de células HTC (VC) tratadas com as diferentes concentrações do extrato bruto de Pau Tenente, incubadas por 24, 48 e 72 horas

Grupos	VC (%)		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	57,15	45,08	50,91
5 µg/mL	100,73	102,10	65,86
10 µg/mL	103,59	110,10	74,22
50 µg/mL	102,36	120,80	81,63
100 µg/mL	99,80	109,90	88,20
200 µg/mL	100,61	105,50	89,69
300 µg/mL	101,00	108,30	83,21
400 µg/mL	106,61	107,90	87,24
500 µg/mL	103,98	115,50	91,39
1000 µg/mL	110,56	118,30	96,88

Fonte: Autoria própria (2018).

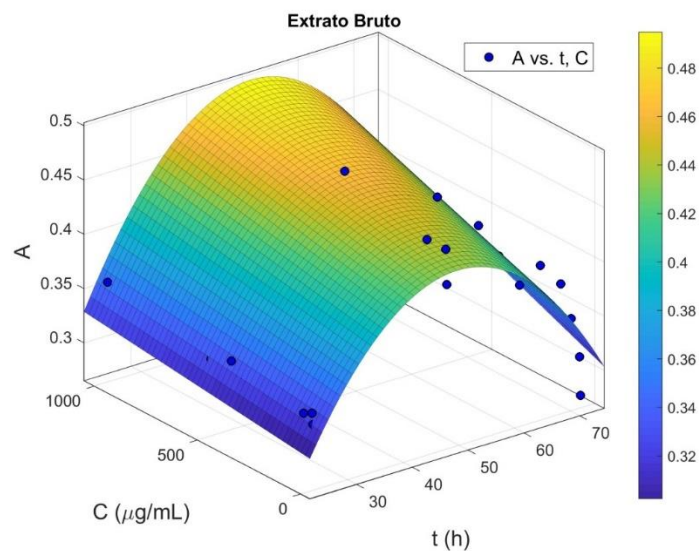
Legenda: CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

Os resultados mostraram 4,5% de rendimento na extração do extrato bruto de Pau Tenente. Assim, apesar dos bons resultados quantitativos, a extração não foi eficiente em termos qualitativos para a citotoxicidade/atividade antitumoral.

A partir da curva ajustada dos dados obtidos para o extrato bruto do Pau Tenente (Figura 11), conseguiu-se obter o polinômio da Equação 2. Seus coeficientes (*a*, *b* e *c*) (Tabela 2) com limites inferiores e superiores de 95% de

confiança foram obtidos pelo *software* Scilab 6.0.1, através do comando “coeff”. Quando os limites dos coeficientes não englobam o zero como resultado, significa que os dados foram bem ajustados, já que a solução nula (0,0,0) não tem significado físico, e nem pode haver um ponto de sela (ponto onde a declividade da superfície é nula). Esse ajuste foi definido pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o qual deve ser o mais próximo de uma unidade para ser o melhor possível. Nesse caso em específico, chegou-se em  $R^2 = 0,8895$ , que mostra que 88,95% dos resultados são explicados pelos fatores estudados, indicando uma boa relação dos dados experimentais com a curva estabelecida pela equação empírica encontrada. Esse resultado é ótimo considerando que dados experimentais nem sempre seguem um padrão, como no caso de Thomas et al. (2006), que comprovam uma boa qualidade da curva obtida através de um maior  $R^2$ . E, a partir destes dados pode-se perceber uma maior dependência da absorvância, ou seja, da viabilidade celular, com o tempo do que com a concentração do extrato bruto.

Figura 11 – Curva ajustada para dados de absorvância versus concentração versus tempo, com extrato bruto de Pau Tenente



Fonte: Autoria própria (2018).

$$A = a.t + b.t.C + c.t^2 \quad (2)$$

Onde:

$A$ : Absorvância;

$C$ : Concentração do composto testado (extrato bruto de Pau Tenente);

$t$ : Tempo de tratamento.

Tabela 2 – Coeficientes da equação da curva ajustada para o experimento com o extrato bruto do Pau Tenente

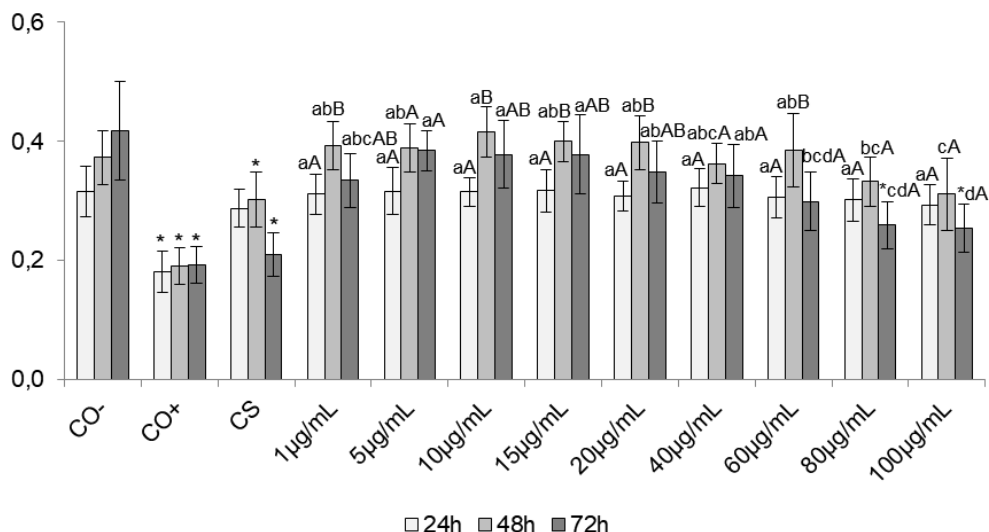
Coeficientes	Valor Médio	Valor Mínimo	Valor Máximo
<b>a</b>	0,0181	0,01741	0,01878
<b>b</b>	$1,123 \cdot 10^{-6}$	$6,029 \cdot 10^{-7}$	$1,642 \cdot 10^{-6}$
<b>c</b>	-0,0001877	-0,0001982	-0,0001772

Fonte: Autoria própria (2018).

## 5.2 QUASSINA

Os dados da Figura 12 apresentam os valores médios das absorvâncias e desvios-padrões obtidos com as células HTC tratadas por 24, 48 e 72 horas com a quassina. A análise estatística indica que nenhuma concentração da quassina foi estatisticamente diferente do controle negativo e, assim, não apresentou efeito citotóxico às células tumorais hepáticas de ratos, somente nos tempos de avaliação de 24 e 48 horas. Inclusive, a viabilidade celular (Tabela 3) foi maior que 92,96% (24 horas) e 83,58% (48 horas). Pode-se notar também um aumento da absorvância do tempo de 24 para 48 horas para todas as concentrações testadas, sendo estatisticamente significativo para as menores concentrações (1, 10, 15, 20 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ), indicando uma proliferação de células HTC no tempo de 48 horas.

Figura 12 – Absorvâncias médias e desvios-padrões de células HTC tratadas com as diferentes concentrações de quassina, incubadas por 24, 48 e 72 horas



Fonte: Autoria própria (2018).

Legenda: CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; CS: Controle Solvente; \*: Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet,  $p < 0,05$ ).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, na comparação entre as concentrações no mesmo tempo de avaliação, e maiúsculas, dentro da mesma concentração nos diferentes tempos de avaliação, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O trabalho de Solis et al. (1993) também mostrou ausência de toxicidade da quassina após 24 horas de tratamento, pelo ensaio de Microwell utilizando *Artemia salina* como bioindicadora em microplacas de 96 poços. Almeida et al. (2007), após 48 horas de tratamento, também confirmou que a quassina foi um dos menos eficientes contra o câncer, testando esta pelo efeito inibitório contra a ativação do antígeno do vírus Epstein-Barr (EBV-EA), induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), em células do tipo Raji.

Já no tempo de 72 horas, as maiores concentrações (80 e 100 µg/mL) foram estatisticamente diferentes do controle negativo e citotóxicas às células HTC, com viabilidades celulares de 60,76% (100 µg/mL) e 61,89% (80 µg/mL) (Tabela 3). Isso pode ter ocorrido porque a quassina, em elevadas concentrações e tempo de tratamento, pode ter atuado como agente citotóxico ou antiproliferativo, e/ou como indutor da diferenciação celular, como mostrado por Mata-Greenwood et al. (2002).

Este efeito já pode ser notado no tempo de 48 horas, onde a comparação entre as diferentes concentrações testadas, no mesmo tempo de avaliação, já indicava diferença entre as menores concentrações (1, 5, 10, 20 e 60 µg/mL) e as maiores concentrações (80 e 100 µg/mL), que apresentaram menores absorvâncias médias e conseqüentemente, menores viabilidades celulares das células HTC. No tempo de 72 horas, este efeito se manteve, sendo que as menores concentrações (1, 5, 10, 15, 20 e 40 µg/mL) também apresentaram absorvâncias estatisticamente diferentes das maiores concentrações (60, 80 e 100 µg/mL).

Tabela 3 – Percentuais de viabilidade de células HTC (VC) tratadas com as diferentes concentrações da quassina, incubadas por 24, 48 e 72 horas

Grupos	VC (%)		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	57,29	51,11	45,95
CS	91,06	80,93	50,10
1 µg/mL	98,66	105,50	79,93
5 µg/mL	100,33	104,40	91,78
10 µg/mL	99,85	111,50	90,38
15 µg/mL	100,45	107,20	90,20
20 µg/mL	97,75	106,70	83,36
40 µg/mL	102,19	97,29	81,78
60 µg/mL	96,92	103,30	71,45
80 µg/mL	95,57	89,14	61,89
100 µg/mL	92,96	83,58	60,76

Fonte: Autoria própria (2018).

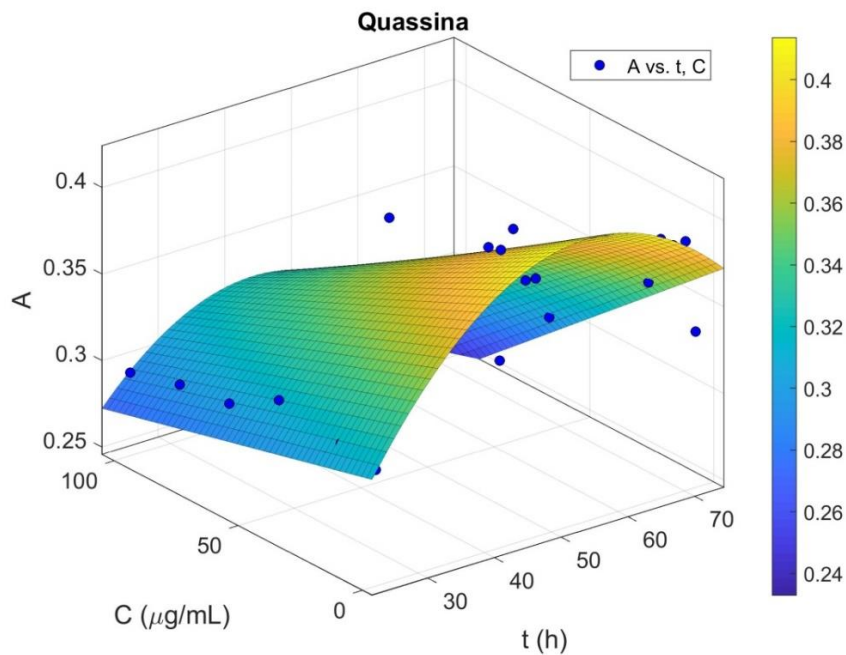
Legenda: CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; CS: Controle Solvente.



Apesar de, em 72 horas de tratamento, a quassina ter apresentado efeito citotóxico/antitumoral, ou seja, ser qualitativamente benéfica, o valor do rendimento de extração deste composto foi de 0,046%, o que é considerado baixo, necessitando neste caso, de adaptações na técnica de extração para melhor eficiência na indústria farmacêutica.

A partir da curva ajustada dos dados obtidos para a quassina (Figura 13), conseguiu-se obter o polinômio da Equação 3, sendo que os valores dos coeficientes da equação gerada estão na Tabela 4. Neste caso, o  $R^2$  foi de 0,8908, que é novamente um valor ótimo, pois 89,08% dos resultados são explicados pelos fatores estudados.

Figura 13 – Curva ajustada para dados de absorvância versus concentração versus tempo, com quassina isolada de Pau Tenente



Fonte: Autoria própria (2018).

$$A = a + b.t + c.t.C + d.t^2 \quad (3)$$

Onde:

$A$ : Absorbância;

$C$ : Concentração do composto testado (quassina de Pau Tenente);

$t$ : Tempo de tratamento.

Tabela 4 – Coeficientes da equação da curva ajustada para o experimento com a quassina do Pau Tenente

Coeficientes	Valor Médio	Valor Mínimo	Valor Máximo
<b>a</b>	0,1322	0,08566	0,1788
<b>b</b>	0,0104	0,008192	0,01261
<b>c</b>	$-1,721 \cdot 10^{-5}$	$-2,075 \cdot 10^{-5}$	$-1,367 \cdot 10^{-5}$
<b>d</b>	$-9,732 \cdot 10^{-5}$	-0,00012	$-7,461 \cdot 10^{-5}$

Fonte: Autoria própria (2018).

Neste caso, pode-se perceber, novamente, uma maior dependência da absorvância (sobrevivência celular) com o tempo do que com a concentração. Esses dados podem ser confirmados pela análise estatística dos dados da Figura 12, já que apenas para concentrações e tempos maiores, considerando todos os coeficientes apresentados, é que a absorvância decai com mais intensidade, demonstrando a mortalidade celular e a citotoxicidade existente.

### 5.3 PARAÍNA

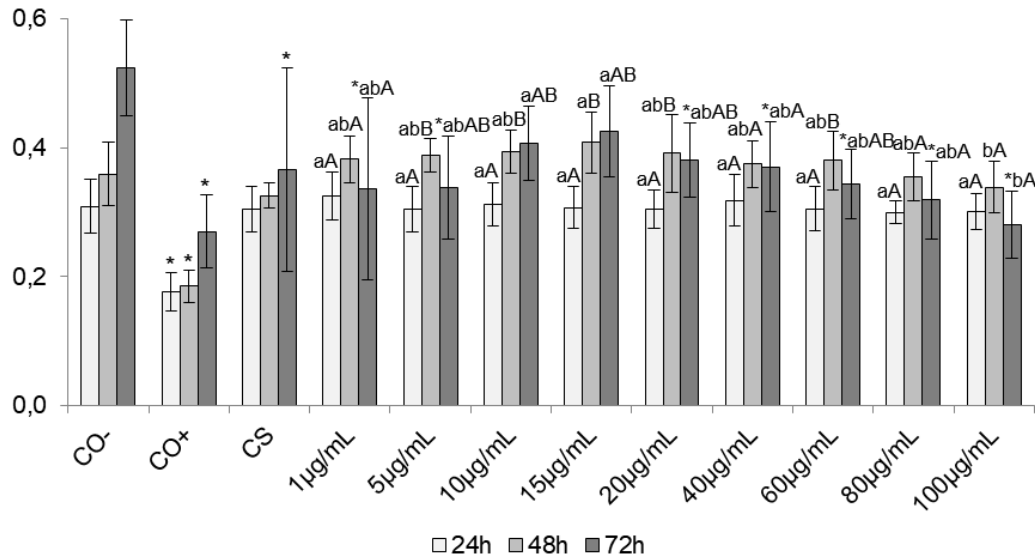
Os dados da Figura 14 apresentam os valores médios das absorvâncias e desvios-padrões obtidos com as células HTC tratadas por 24, 48 e 72 horas com a paraína. A análise estatística indica que nenhuma concentração da paraína foi estatisticamente diferente do controle negativo, nos tempos de avaliação de 24 e 48 horas, não apresentando efeito antitumoral. A viabilidade celular (Tabela 5) nestes casos foi maior que 96,84% (24 horas) e 94,39% (48 horas). Pode-se notar ainda um aumento da absorvância dos tempos de 24 para 48 horas, estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ), para as concentrações de 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g/mL}$ , significando um comportamento de proliferação de células HTC no tempo de 48 horas.

Já no tempo de 72 horas, as concentrações de 1, 5, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de paraína foram estatisticamente diferentes do controle negativo, promovendo a mortalidade das células tumorais HTC, com viabilidades celulares menores que 72,74% e atingindo 53,40% (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 5). Somente as concentrações de 10 e 15  $\mu\text{g/mL}$  não foram citotóxicas no tempo de 72 horas, assim como foram estatisticamente diferentes da concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

Assim, os dados do presente estudo mostram uma nova atividade para a paraína, como antitumoral, independente da concentração, após 72 horas de tratamento. Além disso, das substâncias testadas no presente estudo, a paraína foi a que obteve os melhores efeitos qualitativos em termos de citotoxicidade/atividade

antitumoral para as células HTC, assim como, o seu rendimento de extração (0,132%), pode ser considerado quantitativamente eficiente. Portanto, os dados mostram a eficiência de tornar a paraína viável para uso na indústria farmacêutica.

Figura 14 – Absorbâncias médias e desvios-padrões de células HTC tratadas com as diferentes concentrações de paraína, incubadas por 24, 48 e 72 horas



Fonte: Autoria própria (2018).

Legenda: CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; CS: Controle Solvente; \*: Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet,  $p < 0,05$ ).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, na comparação entre as concentrações no mesmo tempo de avaliação, e maiúsculas, dentro da mesma concentração nos diferentes tempos de avaliação, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5 – Percentuais de viabilidade de células HTC (VC) tratadas com as diferentes concentrações da paraína, incubadas por 24, 48 e 72 horas

Grupos	VC (%)		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	57,13	51,53	51,55
CS	98,41	90,74	70,00
1 µg/mL	105,05	106,40	64,12
5 µg/mL	98,49	108,00	64,53
10 µg/mL	100,96	109,70	77,74
15 µg/mL	99,38	113,70	81,25
20 µg/mL	98,53	109,00	72,74
40 µg/mL	102,87	104,30	70,72
60 µg/mL	98,74	106,00	65,62
80 µg/mL	96,84	98,85	60,86
100 µg/mL	97,48	94,39	53,40

Fonte: Autoria própria (2018).

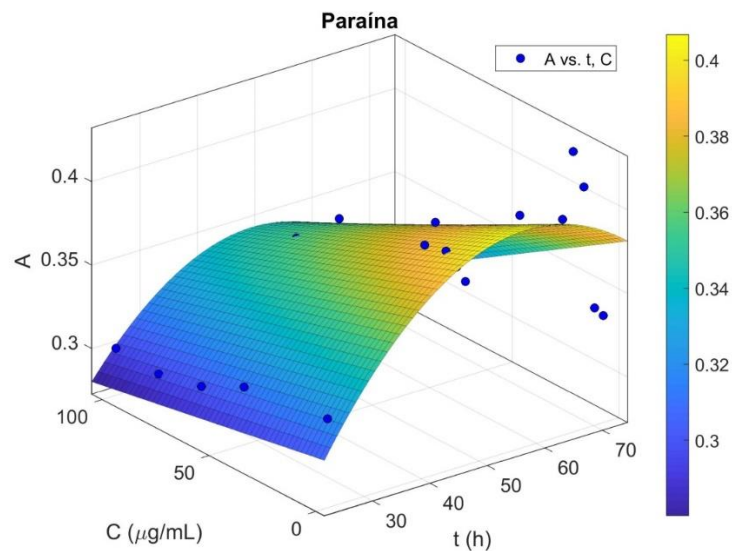
Legenda: CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; CS: Controle Solvente.

A partir da curva ajustada dos dados obtidos para a paraína (Figura 15), conseguiu-se obter o polinômio da Equação 4, sendo que os coeficientes da

equação estão plotados na Tabela 6. Neste caso, o  $R^2$  foi de 0,7633, que também é um valor bom, considerando que dados experimentais nem sempre seguem perfeitamente um padrão e que sistemas biológicos são muito sensíveis.

Observa-se a semelhança entre as Equações 3 e 4, porém os valores dos coeficientes se modificam. Isso quer dizer que o tempo tem uma maior influência sobre a absorvância (viabilidade celular), já que quanto maior o tempo, menor será a absorvância e, conseqüentemente, maior a mortalidade das células cancerosas. Além disso, essa equação e seus coeficientes corroboram com as análises estatísticas, que mostram citotoxicidade da paraína desde as menores concentrações testadas, indicando que o efeito indutor da apoptose ou da morte celular ocorre pela presença do composto, independente da concentração testada, mas influenciada pelo tempo de exposição.

Figura 15 – Curva ajustada para dados de absorvância versus concentração versus tempo, com paraína isolada de Pau Tenente



Fonte: Autoria própria (2018).

$$A = a + b.t + c.t.C + d.t^2 \quad (4)$$

Onde:

$A$ : Absorvância;

$C$ : Concentração do composto testado (paraína de Pau Tenente);

$t$ : Tempo de tratamento.

Tabela 6 – Coeficientes da equação da curva ajustada para o experimento com paraína do Pau Tenente

<b>Coeficientes</b>	<b>Valor Médio</b>	<b>Valor Mínimo</b>	<b>Valor Máximo</b>
<b>a</b>	0,1442	0,08068	0,2078
<b>b</b>	0,009209	0,006197	0,01222
<b>c</b>	$-1,103.10^{-5}$	$-1,585.10^{-5}$	$-6,199.10^{-6}$
<b>d</b>	$-8,15.10^{-5}$	-0,0001125	$-5,05.10^{-5}$

Fonte: Autoria própria (2018).

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados experimentais, o extrato bruto etanólico (80%) e os compostos isolados, quassina e paraína, apresentaram resultados diferentes quanto à atividade antitumoral.

Destaca-se o composto isolado paraína, que nas condições experimentais, demonstrou atividade antitumoral frente às células HTC testadas, com um bom rendimento de extração, quando comparado ao da quassina, e potencial para pesquisas futuras e aplicações na indústria farmacêutica.

Dessa forma, os resultados comprovam a atividade antitumoral da quassina e da paraína, sendo de interesse para a população em geral como uma informação importante e inédita dentre as literaturas encontradas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M. B. et al. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007.
- ALVARENGA, C. F. de et al. Uso de plantas medicinais para o tratamento do *Diabetes mellitus* no Vale do Paraíba – SP. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 2, n. 2, p. 36-44, 2017.
- APERS, S. et al. Antiviral activity of simalikalactone D: a quassinoid from *Quassia africana*. **Planta Medica**, v. 68, n. 1, p. 20-24, jan. 2002.
- BAJAJ, Y. P. S. Medicinal and aromatic plants VI. In: SREENATH, H. L.; JAGADISHCHANDRA, K. S.; BAJAJ, Y. P. S. ***Vetiveria zizanioides* (L.) Nash (Vetiver Grass): in vitro culture, regeneration, and the production of essential oils**. New Delhi: Springer Verlag GmbH, 1994. 426 p.
- BAJAJ, Y. P. S. Medicinal and aromatic plants VI. In: VAN UDEN, W.; PRAS, N.; WOERDENBAG, H. J. ***Linum Species (Flax): in vivo and in vitro accumulation of lignans and other metabolites***. New Delhi: Springer Verlag GmbH, 1994. 426 p.
- BAJAJ, Y. P. S. Medicinal and aromatic plants VI. In: WIDHOLM, J. M.; KUMLEHN, J.; NAGATA, T. ***Biotechnology in agriculture and forestry***. New Delhi: Springer Verlag GmbH, 1994. 426 p.
- BARBETTI, P. et al. Quassinoids from *Quassia amara*. **Phytochemistry**, Perugia (IT), v. 32, n. 4, p. 1007-1013, 1993.
- BARBEZAN, A. B. **Estudos *in vitro* da genotoxicidade e citotoxicidade em células hepáticas da formação de 2-alcilciclobutanonas resultantes da irradiação de alimentos que contenham gordura**. 2017. 129 p. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- BARROS, J. S. **Atividade farmacológica geral e específica do extrato aquoso e da fração butanólica de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) e efeito dos compostos isolados nas p-atpases de mamíferos H<sup>+</sup>.K<sup>+</sup>-atpase e CA<sup>2+</sup>-atpase**. 2010. 135 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia na Área de Concentração Biotecnologia para a Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, 2010.
- BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida *malation*, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos**. 2008. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.
- DEBENEDETTI, S. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of Argentinian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2-3, p. 163-166, maio 2002.

DÜSMAN, E. **Efeito do sistema de produção, da irradiação pós-colheita, do processamento e da estocagem, de sucos de *Vitis labrusca* L., na citotoxicidade e mutagenicidade, em células HTC.** 2014. 153 p. Tese (Doutorado em Biologia das Interações Orgânicas) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, 2014.

FERNAND, V. E. **Initial characterization of crude extracts from *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. and *Quassia amara* L. using normal phase thin layer chromatography.** 2003. 70 p. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Pós-Graduação da Universidade Estadual da Louisiana e Faculdade Agrícola e Mecânica, Universidade do Suriname, 2003.

FERRAZ, S. et al. **Manejo sustentável de fitonematoíodes.** 1. ed. Viçosa: UFV, 2010.

FIASCHETTI, G. et al. Quassinoids: from traditional drugs to new cancer therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 13, 2011.

GOMES, M. A. et al. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 514-524, set. 2013.

GOMES, P. R. M.; FIRMO, W. C. A.; VILANOVA, C. M. estudo etnobotânico de plantas medicinais hipoglicemiantes no Bairro Maracanã no Município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Scientia Plena**, v. 10, n. 9, p. 1-11, 2014.

HENWOOD, J. M.; BROGDEN, R. N. Etoposide: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in combination chemotherapy of cancer. **Drugs**, v. 39, n. 3, p. 438-490, mar. 1990.

HUSAIN, G. M. et al. Antidiabetic activity of standardized extract of *Quassia amara* in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 12, p. 1806-1812, dez. 2011.

IMAMURA, K. et al. Bruceanols D, E and F: three new cytotoxic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 12, p. 2091-2097, 1993.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Fígado.** Rio de Janeiro: 2018a. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/figado>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Câncer de fígado.** Rio de Janeiro: 2018b. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=330](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330)>. Acesso em: 10 nov. 2018.



INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Ministério da Saúde). **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2018c. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

JOSIANE, M. et al. Modulation of the mutagenic effect of benzo[a]pyrene and bleomycin by isoflavone extracts in a rat hepatoma cell line. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 11-20, jun. 2012.

KUO, P. et al. Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 537-544, mar. 2004.

LANG'AT, C. C. et al. Semisynthetic derivatives of quassin. **Tetrahedron**, v. 54, n. 24, p. 6841-6856, jun. 1998.

LOPES, G. L. **Picrasma crenata Vell. Engl.** Unicentro, 2012. Disponível em: <<https://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/files/2012/04/3-Picrasma-crenata-Vell.-Engl.jpg>>. Acesso em: 07 nov. 2018.

MATA-GREENWOOD, E. et al. Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G(1) arrest is associated with down-regulation of c-myc. **Leukemia**, v. 16, n. 11, p. 2275-2284, 2002.

MATEUS, M. A. F. **Extratos aquosos de plantas medicinais no controle de nematoides das galhas**. 2012. 59 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2012.

MENEZES, J. **A vida é muito para ser insignificante**. O Segredo, 2013. Disponível em: <<https://osegredo.com.br/a-vida-e-muito-para-ser-insignificante/>>. Acesso em 10 nov. 2018.

MONTEIRO, V. de F. F. et al. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 281-287, 2002.

MORITA, H. et al. New quassinoids from the roots of *Eurycoma longifolia*. **Chemistry Letters**, v. 19, n. 5, p. 749-752, 1990.

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

NCI – National Cancer Institute. **Liver (Hepatocellular) Cancer Prevention (PDQ) – Patient Version**. EUA: 2018a. Disponível em: <[https://www.cancer.gov/types/liver/patient/liver-prevention-pdq#section/\\_21](https://www.cancer.gov/types/liver/patient/liver-prevention-pdq#section/_21)>. Acesso em: 07 nov. 2018.

NCI – National Cancer Institute. **Side effects of cancer treatment**. EUA: 2018b. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects>>. Acesso em: 07 nov. 2018.

NCI – National Cancer Institute. **What is cancer?**. EUA: 2015. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 07 nov. 2018.

NOVELLO, C. R. et al. Toxicological and pharmacological studies of *Picrasma crenata* (Vell.) Engler (Simaroubaceae) in mice and rats. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 3, p. 345-348, 2008.

OCAMPO, R.; BALICK, M. J. **Plants os Semillas sagradas**. Costa Rica: Ed. HerbalGram, 2010.

OHNISHI, S. et al. Bruceosides D, E and F, three new cytotoxic quassinoid glucosides from *Brucea javanica*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 7, p. 1032-1038, 1995.

OLIVEIRA, F. A. et al. Potencial de cura e segurança do uso de plantas medicinais na utilização do método da biodigital como tratamento alternativo no grupo de medicina alternativa em Juiz de Fora, MG. **Perspectivas Online: biológicas & saúde**, Campos dos Goytacazes, v. 17, n. 5, p. 47-63, 2015.

OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

OLIVEIRA, R. J. et al. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of  $\beta$ -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 7, p. 1225-1233, out. 2006.

OZEKI, A. et al. Cytotoxic quassinoids from *Simaba cedron*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 6, p. 776-780, 1998.

PIRANI, J. R. **Simaroubáceas**. Santa Catarina: Flora Ilustrada Catarinense, 1997.

POLONSKY, J. Quassinoid bitter principles II. **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 47, p. 221-264, 1985.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAJASEKARAN, S.; SIVAGNANAM, K.; SUBRAMANIAN, S. Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Pharmacological Reports**, v. 57, n. 1, p. 90-96, jan.-fev. 2005.

RAJI, Y.; BOLARINWA, A. F. Antifertility activity of *Quassia amara* in male rats – *in vivo* study. **Life Sciences**, v. 61, n. 11, p. 1067-1074, 1997.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, jun. 2003.

ROLDÁN, I. et al. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, v. 49, n. 3, p. 492-504, fev. 2007.

ROSATI, A. et al. Quassinoids can induce mitochondrial membrane depolarization and caspase 3 activation in human cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, n. 2, p. 216-218, dez. 2004.

SILVA, C. B. da. **Avaliação da atividade antitumoral em extrato de Indigofera suffruticosa Mill.** 2008. 81 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

SIMONETTI, A. C. **Atividade antitumoral e toxicidade de nanocápsulas contendo o ácido fumarprotocetrárico isolado de *Cladonia verticillares* (líquen).** 2004. 64 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SOLIS, P. N. et al. A Microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Medica**, v. 59, n. 3, p. 250-252, 1993.

TADA, H. et al. New antiulcer quassinoids from *Eurycoma longifolia*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 345-349, abr. 1991.

TEIXEIRA, G. da S. et al. Plantas medicinais, fitoterápicos e/ou nutracêuticos utilizados no controle da obesidade. **FLOVET**, v. 1, n. 6, p. 27-42, 2014.

THOMAS, C. et al. Comparação de equações volumétricas ajustadas com dados de cubagem e análise de tronco. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 3, p. 319-327, 2006.

TOMA, W. et al. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 9, p. 1151-1155, 2002.

VON BUEREN, A. O. et al. Anti-proliferative activity of the quassinoid NBT-272 in childhood medulloblastoma cells. **BMC Cancer**, v. 7, n. 9, p. 1-11, jan. 2007.