

Avaliação da citotoxicidade de compostos extraídos da *Croton echinoides* Baill

Cytotoxicity evaluation of compounds extracted from *Croton echinoides* Baill

RESUMO

O carcinoma hepatocelular é uma das doenças malignas que mais tem aumentado em número no mundo. A busca pelo tratamento, cura e prevenção deste e de outros cânceres e devido à grande utilização de plantas com fins medicinais, vários estudos têm focado na obtenção de fitofármacos à base de extratos vegetais. A *Croton echinoides* Baill, conhecida como “quebra fraca”, “caatinga branca” e “canela de velho”, é uma planta medicinal brasileira da família Euphorbiaceae, é uma fonte de metabólitos secundários, como alcalóides, aminoácidos, cardenólidos, fenóis simples, flavonóides, proantocianidinas, quinonas, saponinas, taninos, triterpenos/esteróis. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica dos compostos lupeol e diterpeno, extraídos e isolados da planta *C. echinoides*, sobre as células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC) expostas por 24, 48 e 72h às concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL de meio de cultura, pelo teste do MTT. Os resultados das absorvâncias médias e desvios padrões mostram que o composto lupeol induziu a atividade mitocondrial e/ou a proliferação das células HTC nos tempos de 48 e 72 horas. Já o diterpeno não apresentou atividade citotóxica/antitumoral para as células nessas concentrações. Assim, outros estudos, com outros extratos e compostos desta planta devem ser realizados, a fim de identificar atividades antitumorais desta planta.

PALAVRAS-CHAVE: Antitumoral. Hepatoma. Lupeol.

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma is one of the fastest growing malignancies in the world. The search for the treatment, cure and prevention of this and other cancers and due to the large use of medicinal plants, several studies have focused on obtaining herbal extracts based on plant extracts. *Croton echinoides* Baill, known as “weak break”, “white caatinga” and “old cinnamon”, is a Brazilian medicinal plant of the Euphorbiaceae family. It is a source of secondary metabolites such as alkaloids, amino acids, cardenolides, simple phenols, flavonoids, proanthocyanidins, quinones, saponins, tannins, triterpenes/sterols. In this sense, the aim of the present study was to evaluate the cytotoxic activity of lupeol and diterpene compounds, extracted and isolated from the plant *C. echinoides*, on *Rattus norvegicus* (HTC) liver tumor cells exposed for 24, 48 and 72h at concentrations of 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 and 100 µg/mL culture medium by the MTT test. The mean absorbance and standard deviation results show that lupeol induced mitochondrial activity and/or HTC cell proliferation at 48 and 72 hours. Diterpene showed no cytotoxic/antitumor activity to

Suzan Roberta Tombini Venturella
sventurella@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Cláudio Roberto Novello
crnovello@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Elisangela Düsman
edusman@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



cells at these concentrations. Thus, further studies with other extracts and compounds of this plant should be performed in order to identify antitumor activities of this plant.

KEYWORDS: Antitumor. Hepatoma. Lupeol.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais como remédio alternativo tem aumentado no mundo todo nas últimas décadas. A maioria dessas plantas não são tóxicas, seguras e fáceis de obter (LAXMAN, 2019). De acordo com a OMS, em 1999, em muitos países, boa parte da população fazia uso de medicamentos tradicionais, especialmente o de plantas medicinais. Apesar do fácil acesso ao medicamento moderno, o uso dessas ervas manteve sua popularidade por questões populacionais e históricas (AGRA et al., 2007).

Assim, devido à grande utilização de plantas com fins medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças, vários estudos têm focado na obtenção de extratos e compostos isolados de vegetais com atividade antitumoral.

O *Croton* sp., por exemplo, é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae e é uma fonte de metabólitos secundários com comprovadas atividades farmacológicas, como alcaloides, aminoácidos, cardenólidos, fenóis simples, flavonoides, proantocianidinas, quinonas, saponinas, taninos, triterpenos/esteróis (HILL et al., 2001). A *Croton echioides* Baill, por exemplo, é uma planta medicinal brasileira conhecida como “quebra fraca”, “caatinga branca” e “canela de velho”. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica/antitumoral dos compostos lupeol e diterpeno, extraídos e isolados de *C. echioides* sobre as células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC).

METODOLOGIA

As células HTC foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em estufa do tipo BOD a 37°C.

Para o teste de citotoxicidade/atividade antitumoral, foi realizado o ensaio do MTT, de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas $2,0 \times 10^4$ células de HTC, com exceção dos poços de controle sem células (branco). Após estabilização, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio completo para os grupos: controle negativo (C-), controle positivo (C+) com agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 50 µM), controle solvente (CS) com dimetilsulfóxido (DMSO) na mesma concentração dos compostos, e diferentes concentrações para o lupeol e o diterpeno (1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL de meio de cultura).

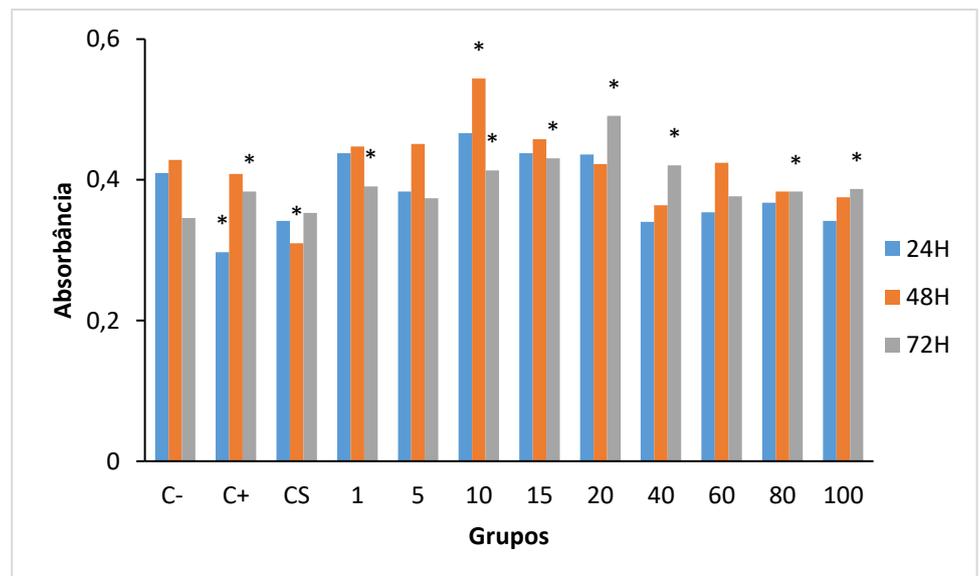
Após 24, 48 e 72 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura acrescido de MTT (0,2 mg/mL). As placas foram incubadas por mais quatro horas antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em leituras de microplacas (Labtech) a 550 nm. Os experimentos foram realizados em três repetições independentes.

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (*one way ANOVA*), seguida do teste de Dunnett, pelo *software GrafPad® Prism 5*. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados da Figura 1 apresentam os resultados das absorbâncias médias do tratamento com o composto lupeol. A análise estatística mostrou que no tempo de 24 horas nenhuma concentração do lupeol apresentou efeito sobre as células tumorais HTC. No tempo de 48 horas, a concentração de 10 µg/mL, e no tempo de 72 horas, as concentrações de 1, 10, 15, 20, 40, 80 e 100 µg/mL, apresentaram absorbâncias médias estatisticamente maiores que a do controle negativo, indicando um estímulo da atividade mitocondrial e/ou da proliferação celular das HTC expostas ao lupeol.

Figura 1 – Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de *Rattus norvegicus* tratadas com as diferentes concentrações (µg/mL) do composto lupeol de *C. echinoides*.

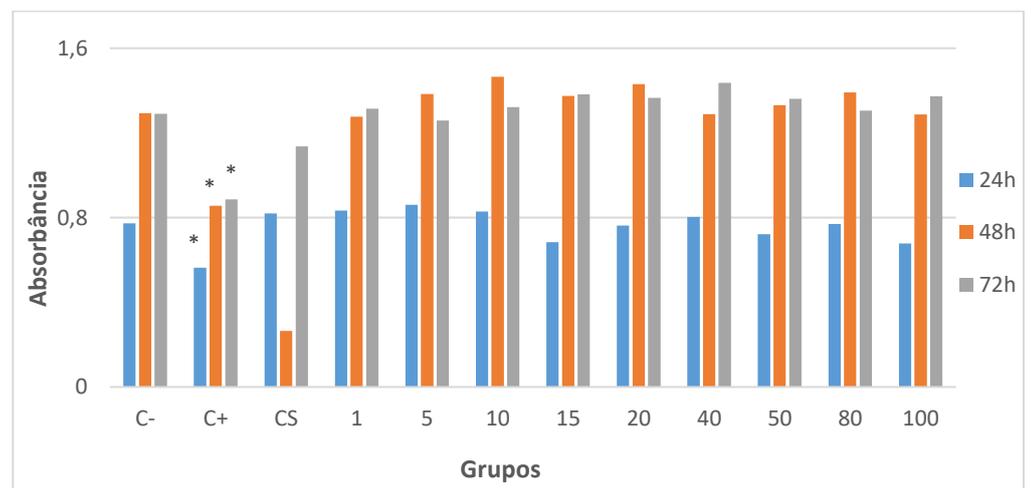


C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo; CS: Controle Solvente; 2,0 x10⁴ células por poço, incubadas por 24, 48 e 72 h. * Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (C-), pelo teste de Dunnett (p<0,05). Fonte: Autoria própria (2019).

Os dados da Figura 2 apresentam os resultados das absorvâncias médias do tratamento com o composto diterpeno. A análise estatística não mostrou diferença estatística entre as absorvâncias dos tratamentos com as diferentes concentrações deste e o controle negativo, em todos os tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas). Assim, os dados mostram que este composto, extraído e isolado do *C. echoides* não apresentou potencial citotóxico para as células tumorais hepáticas utilizadas no presente estudo, nas concentrações e tempos avaliados.

Estes resultados são divergentes dos encontrados por Mello et al. (2010), que mostraram atividade antitumoral de alcaloides obtidos do extrato etanólico de *C. echoides*. Assim, possivelmente, outros extratos e o compostos de *C. echoides*, que não o lupeol e diterpeno, estejam relacionados a atividade antitumoral desta planta.

Figura 2 – Absorvância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de *Rattus norvegicus* tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do composto diterpeno de *C. echoides*.



C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo; CS: Controle Solvente; $2,0 \times 10^4$ células por poço, incubadas por 24, 48 e 72 h. * Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (C-), pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: Autoria própria (2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo não identificaram atividade antitumoral dos compostos lupeol e diterpeno, extraídos e isolados de *C. echoides*, mostrando que outros estudos, com outros extratos e compostos desta planta devem ser realizados, a fim de identificar atividades antitumorais.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. de F.; FREITAS, P.F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

HILL, A.P.; DOMINICIS, M.E.; MAYOR, J.; OQUEANDO, M.; SARDUY, R. Tamizaje fitoquímico preliminar de espécies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 35, n. 3, p. 203-206, 2001.

LAXMAN, K.; HARINATH, M. In-vitro assessment of CYP3A4 and CYP2C9 inhibition potential of Lupeol using human liver microsomes. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n.2, p. 231-236, 2019.

MELLO, J.; NOVELLO, C.; PIRES, M.; NOCCHI, S.; NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.; DIAS FILHO, B.; MARQUES, L.; VIDOTTI, G.; SARRAGIOTTO, M. In vitro cytotoxic activity of índole alkaloids from *Croton echioides*. **Planta Medica**, v. 76, p. P373, 2010. DOI: 10.1055/s-0030-1264671.

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