

Estudo da atividade citotóxica/antitumoral de análogos da capsaicina in vitro

Study of cytotoxic/antitumor activity of capsaicin analogs in vitro

RESUMO

Vanessa Andreis Marafon dos Santos
vanessamarafon@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

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

Alessandra Machado
amachado@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

O consumo regular de alimentos contendo pimenta é observado ao redor do mundo e está atrelado a várias culturas. Estudos relativos às atividades biológicas geradas a partir desse consumo demonstram sua importância perante doenças crônicas, sistema cardiovascular, respiratório, entre outros. Todavia, um dos motivos que desencorajam o consumo desses alimentos é a sensação de pungência sentida após a ingestão, sendo essa ocasionada pela capsaicina. Com o intuito de tentar amenizar essa característica de pungência da capsaicina, foi realizada a síntese do composto 4-OH-3-OMe-N-benziltetradecanamida, o qual possui uma estrutura química semelhante à da capsaicina. Para a comparação biológica foi realizado o teste de citotoxicidade/atividade antitumoral do MTT com as células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus*. Estas células foram tratadas com as concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 125 μM dos dois compostos, por 24 e 48 horas. Os resultados obtidos mostram que, em 24 horas, somente a maior concentração testada da capsaicina apresentou efeito citotóxico. E, em 48 horas, somente as concentrações de 100, 150, 175 e 200 μM do análogo apresentaram este efeito. Assim, possivelmente pela diferença estrutural, o 4-OH-3-OMe-N-benziltetradecanamida apresentou menos pungência e melhor atividade citotóxica que a capsaicina.

PALAVRAS-CHAVE: Antitumoral. MTT. Atividade biológica.

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.



ABSTRACT

Regular consumption of pepper-containing foods is observed around the world and is linked to various cultures. Studies related to the biological activities generated from this consumption demonstrate its importance in relation to chronic diseases, cardiovascular system, respiratory, among others. However, one of the reasons that discourage the consumption of these foods is the pungent sensation felt after ingestion, which is caused by capsaicin. In order to try alleviate this pungency of capsaicin, the synthesis of the compound 4-oh-3-ome-n-benziltetradecanamide, which has a chemical structure similar to that of capsaicin, was synthesized. For biological comparison, the mtt cytotoxicity/antitumor activity test was performed with *rattus norvegicus* liver tumor cells. These cells were treated with concentrations of 10, 25, 50, 75, 100 and 125 μM of the two compounds for 24 and 48 hours. The results show that in 24 hours only the highest tested concentration of capsaicin had cytotoxic effect. And within 48 hours, only the 100, 150, 175 and 200 μM concentrations of the analogue showed this effect. Thus, possibly due to the structural difference, 4-oh-3-ome-n-benzyl tetradecanamide showed less pungency

and better cytotoxic activity than capsaicin.

KEYWORDS: Antitumor. MTT. Biological activity.

INTRODUÇÃO

A capsaicina é o principal responsável pelo sabor picante característico dos alimentos que possuem pimenta. Ela tem ação antimicrobiana e antioxidante (MOLINA-TORRES et. al., 1999, ANTONIOUS et al, 2006). Além de apresentar diferentes atividades biológicas como: estimulador do sistema cardiovascular e respiratório, anti-inflamatório, antinociceptivo, neurotóxico, potenciador da catecolamina adrenal e antimicrobiano (SANCHO et. al., 2002; MORITA et. al., 2006; WANG. et. al., 2009). Além de todas estas atividades biológicas, recentemente também vem sendo investigada sua atividade como agente antiproliferativo, sendo responsável pela supressão do crescimento tumoral, todavia seu mecanismo de inibição ainda desconhecido gera grande especulações (DAMIÃO, 2014).

Entretanto essa molécula apresenta alguns efeitos indesejáveis, como pungência e irritação da pele e mucosas (CASTILLO et al., 2007). Sua estrutura apresenta uma ligação amida que conecta um anel vanilílico com uma cadeia acila. Visando manter as características positivas relacionadas às atividades biológicas descritas enquanto se ameniza os efeitos de pungência sentidos, a síntese de análogos é uma alternativa. Análogos como o 4-OH-3-OMe-N-benziltetradecanamida dentre vários outros são alternativas apresentadas na literatura para o uso da Capsaicina.

Com o intuito de analisar a semelhança entre o análogo sintetizado e a capsaicina, diferentes testes podem ser realizados, entre eles o da citotoxicidade/atividade antitumoral. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar a atividade citotóxica/antitumoral entre a capsaicina e o 4-OH-3-OMe-N-benziltetradecanamida, pelo ensaio de MTT, utilizando células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC).

METODOLOGIA

A capsaicina e seu análogo 4-OH-3-OMe-N-benziltetradecanamida foram dissolvidos conjuntamente em dimetilsulfóxido (DMSO) e em tampão fosfato-salino (PBS). Em seguida, foram utilizados nas soluções tratamento nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 μM .

Para o teste de citotoxicidade/atividade antitumoral foi realizado o ensaio do MTT ((3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações, que é baseado na absorção óptica e análise da diminuição das funções celulares.

Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada um foram semeadas $2,0 \times 10^4$ células HTC. Após estabilização, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 μL de meio completo para os grupos: controle negativo (CO-), uma substância que se tem certeza que não afetará a funcionalidade da célula, nesse caso utilizado o meio de cultura, controle positivo (CO+) com o agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 50 μM), sendo essa uma mistura que afetará a funcionalidade celular, controle solvente (CS) com DMSO (200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ meio de cultura), para observar o efeito deste solvente nas células, e as diferentes concentrações da capsaicina e seu análogo 4-OH-3-OMe-N-benziltetradecanamida.

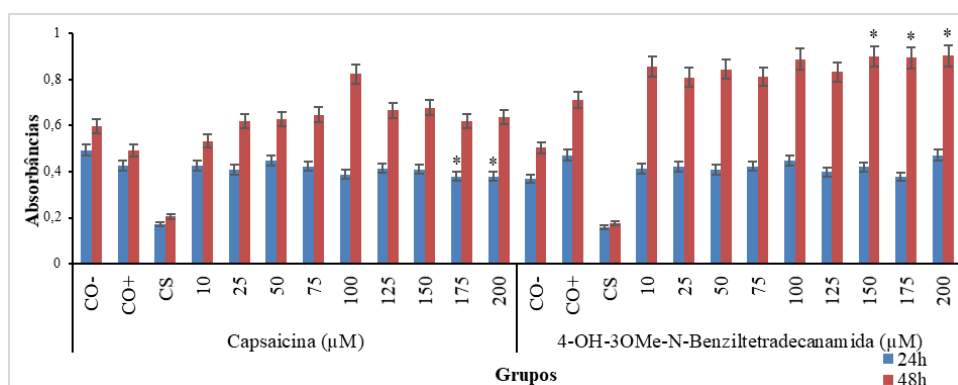
Após 24 e 48 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por 100 μL de meio de cultura, acrescido de MTT (0,2 mg/mL). A placa foi incubada por mais 4 h antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100 μL de DMSO. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (Labtech) a 550nm. Os experimentos foram realizados em três repetições independentes e a comparação estatística, através do software Instat, das médias das absorbâncias foi feita pelo teste de Tukey ($n=3$, $p=0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos (Figura 1) mostram que, para a capsaicina, apenas a maior concentração testada (200 μM) apresentou efeito citotóxico/antitumoral no tempo de 24 horas. Para o análogo, nesse mesmo tempo de experimento, nenhuma concentração apresentou citotoxicidade.

Após 48 horas de experimento, observa-se que nenhuma das concentrações testadas de capsaicina apresentou atividade citotóxica/antitumoral. Quanto ao análogo, quatro concentrações apresentaram citotoxicidade (100, 150, 175 e 200 μM). Desta forma, possivelmente, a diferença estrutural dos compostos pode ter resultado na melhor atividade citotóxica do análogo no tempo de 48 horas, onde desde a concentração de 100 μM o efeito já foi verificado.

Figura 1: Absorbâncias médias dos grupos controle negativo (CO-), positivo (CO+) e solvente (CS) e tratados com as diferentes concentrações de capsaicina e 4-OH-3-OMe-N-benziltetradecanamida, após 24 e 48h de tratamento.



* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (CO-). Fonte: Autoria própria (2019).

CONCLUSÕES

Por meio deste estudo foi possível detectar diferenças na atividade citotóxica/tumoral entre a capsaicina e análogo, sendo a ação da capsaicina mais rápida que a do análogo, porém, de pouca durabilidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a UTFPR- Campus Francisco Beltrão e a Fundação Araucária pelo apoio necessário para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ANTONIOUS, G. F.; KOCHHAR, T. S.; JARRET, R. L.; SNYDER, J. C. Antioxidants in hot pepper: Variation among accessions. *Journal of Environmental Science and Health*. v. B41, p. 1237-1243, 2006.

CASTILLO, E.; TORRES-GAVILÁN, A.; SEVERIANO, P.; ARTURO, N.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues. *Food Chemistry*, 2005.

DAMIÃO, M. C. F. C. B. Planejamento e síntese de análogos da Capsaicina e avaliação da atividade antitumoral. Dissertação de mestrado. USP, 2014.

MORITA, A.; IWASAKI, Y.; KOBATA, K.; IIDA, T.; HIGSHI, T.; ODA, K.; SUZUKI, A.; NARUKAWA, M.; SASAKUMA, S.; YOKOGOSHI, H.; YAZAWA, S.; TOMINAGA, M.; WATANABE, T.; *Life Sci*. 2006, 79, 2303-2310.

MOLINA-TORRES, J.; GARCÍA-CHÁVEZ, A.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E. Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: capsaicin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 241-248, 1999.

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.

SANCHO, R.; LUCENA, C.; MACHO, A.; CALZADO, M. A.; BLANCO-MOLINA, M.; MINASSI, A.; APPENDINO, G.; MUNOZ, E. *Eur. J. Immunol*. 2002. 32. 1753-1763.

WANG., B.; YANG, F.; SHAN, Y.; QIU, W.; TANG, J. Highly eficiente synthesis of capsaicin analogues by condensation of vanillylamine and acyl chlorides in a biphase H₂O/CHCl₃ system. Tetrahedron. v. 65, p. 5409-5412. 2009.