

Extração sólido-líquido de compostos da *Averrhoa Carambola* L. e avaliação de sua atividade citotóxica

Solid-liquid extraction of *Averrhoa Carambola* L. compounds and evaluation of their cytotoxic activity

RESUMO

Nas últimas décadas vários estudos têm focado na utilização de plantas medicinais, seus extratos ou seus compostos isolados para a obtenção de quimioterápicos mais eficazes no tratamento de cânceres. Neste sentido, as frutas possuem destaque, visto que são ricas em compostos bioativos. A carambola, por exemplo, fruto proveniente da caramboleira, possui vários nutrientes essenciais e vitaminas em sua composição, além de antioxidantes. Assim, o presente projeto teve por objetivo a extração sólido-líquido de compostos da fruta carambola, com maturação verde e madura, e análise das suas citotoxicidades/atividades antitumorais frente as células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC). No tempo de 24 horas, o extrato etanólico bruto de carambola madura, nas concentrações de 200, 500 e 1000 µg/mL, apresentou efeito indutor da proliferação celular, e o extrato da fruta verde, não apresentou nenhum efeito sobre as células HTC. No tempo de 48 horas, todas as concentrações do extrato etanólico bruto de carambola madura induziram a divisão celular tumoral, assim como as concentrações de 10 e 500 µg/mL do extrato de carambola verde. No tempo de 72 horas, a indução a divisão celular cessou em ambos os extratos verde e maduro. Assim, os dados do presente estudo mostram que outros solventes devem ser avaliados para testes com a fruta carambola, para a obtenção de extratos mais eficientes em termos biológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Carambola. Citotoxicidade. Extração.

ABSTRACT

In the last decades, several studies have focused on the use of medicinal plants, their extracts or their isolated compounds to obtain more effective chemotherapeutic drugs for cancer treatment. In this sense, the fruits are highlighted, as they are rich in bioactive compounds. Star fruit, for example, fruit from star fruit, has several essential nutrients and vitamins in its composition, as well as antioxidants. Thus, the present project aimed the solid-liquid extraction of green and mature ripening fruit compounds and analysis of their cytotoxicity/antitumor activities against *Rattus norvegicus* (HTC) hepatoma cells. At 24 hours, the raw ethanolic extract of ripe starfruit, at concentrations of 200, 500 and 1000 µg/mL, showed cell proliferation inducing effect, and green fruit extract showed no effect about HTC cells. Within 48 hours, all concentrations of the ripe starfruit crude ethanol extract induced tumor cell division, as well as the 10 and 500 µg/L concentrations of the green starfruit extract. At the time of 72 hours, the cell division induction ceased in both green and mature extracts. Thus, the data from the present study show that other solvents should be evaluated for testing with star fruit to obtain more biologically efficient extracts.

KEYWORDS: Star fruit. Cytotoxicity. Extraction.

Mecshim Marie Cadoná
mecshimmk@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Profa. Dra. Elisângela Düsman
lisdusman28@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Irede Angela Lucini Dalmolin
irededalmolin@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Eduardo Michel Vieira Gomes
eduardomvg1402@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Lilian Tatiani Düsman Tonin
liliandusman@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil.

INTRODUÇÃO

A extração é uma operação físico-química muito utilizada para isolar compostos e substâncias de vegetais a serem aplicados em testes, em especial de atividade citotóxica, antitumoral ou quimioterápica (FERREIRA, 2013).

Para testar o potencial de ação antitumoral, são realizados principalmente testes *in vivo* e *in vitro* (SIMONETTI, 2004). Dentre estes testes, destaca-se os ensaios com células de hepatoma de *RattusNorvegicus* (HTC), onde estas verificam a influência das substâncias tóxicas pela metabolização de compostos químicos estranhos ao organismo (MANTUANELLI, 2015).

A carambola é um fruto proveniente da caramboleira (*Averrhoa carambola* L.) e possui vários nutrientes essenciais e vitaminas em sua composição, como água, ferro, potássio, fósforo, cálcio, magnésio, zinco, rico em antioxidantes e vitamina c, que é um antioxidante muito indicado por ser considerado um dos mais poderosos de sua classe (FRAGOSO, 2013). Segundo estudos, os antioxidantes têm efeito indutor do apoptose e inibidor do crescimento tumoral (CARVALHO, LOCATELLI, 2009).

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a citotoxicidade do extrato etanólico de carambolas maduras e verdes, frente as células tumorais de hepatoma de *RattusNorvegicus* (HTC), visando obter maiores conhecimentos sobre os efeitos celulares desta fruta.

MATERIAIS E MÉTODOS

PREPARO DOS EXTRATOS

Para o preparo dos extratos brutos foram adicionadas 100 g da polpa *in natura* de carambola verde ou madura (turborizadas) em 500 mL do solvente extrator (etanol 99,8% (CH₃CH₂OH)). Então, estes foram mantidos em agitação magnética por 2 horas ao abrigo de luz à temperatura ambiente (PALIOTO et al., 2015).

Após, os extratos foram filtrados a vácuo utilizando gaze como filtro e diluídos em um balão volumétrico de 1000 mL, com o solvente, para se obter extratos na concentração final de 0,1 g mL⁻¹. O solvente etanol foi recuperado através da separação dos extratos por rotaevaporação pelo equipamento Rotaevaporador FISATOM. Este procedimento foi realizado por 12 h em temperatura máxima de 40 °C, para que não ocorresse a degradação dos agentes nutracênticos dos extratos.

O rendimento máximo da extração foi determinado em aparelho de extração projetado por Franz von Soxhlet (SOXHLET,1879). Os cartuchos foram recheados com 5 g de carambola verde ou madura picados em pequenos pedaços e foram dispostos no equipamento de extração Soxhlet em contato com o solvente etanol. O equipamento foi ajustado para atingir a temperatura de ebulição do solvente (78,5 °C) e foi operado por 8h ininterruptas. Por fim, o solvente foi evaporado e os balões que continham os extratos finais foram colocados em dessecador até esfriamento. O cálculo do rendimento é feito a partir da massa de extrato livre de

solvente obtida em relação à massa inicial da carambola submetida à extração, conforme Equação 1.

$$\text{Rendimento máximo} = \frac{\text{massa final do extrato}}{\text{massa inicial da amostra}} * 100 \quad (1)$$

Os resultados das médias dos rendimentos foram comparados pelo teste de T não-pareado ($\alpha=0,05$; $n=3$), pelo programa GraphPadInstat.

TESTE DE CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL

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

O ensaio de citotoxicidade do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazoliumbromide] seguiu o protocolo sugerido por Mosmann (1983). Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas $2,0 \times 10^4$ células. Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e adicionado 100 μ L de meio novo com os tratamentos: controle negativo (meio de cultura), tratamento com o agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS) (concentração final de 150 μ M) e tratamentos com os extratos etanólicos dos frutos verdes (EV) e maduros (EM) de carambola, diluídos em meio de cultura, nas concentrações finais de 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 μ g mL⁻¹.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas, e após este tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 μ L de meio livre de soro, acrescido de MTT na concentração de 0,167 mg/mL. A placa foi incubada por mais 4 horas e, na sequência, o meio contendo MTT foi descartado e aos poços foram adicionados 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), para diluição dos cristais de formazan formados. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (FlexStation) a 550 nm.

A análise estatística, para a comparação das médias das absorbâncias, foi feita por análise de variância (oneway ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$, $p<0,05$, $n=8$), pelo programa ActionStat.

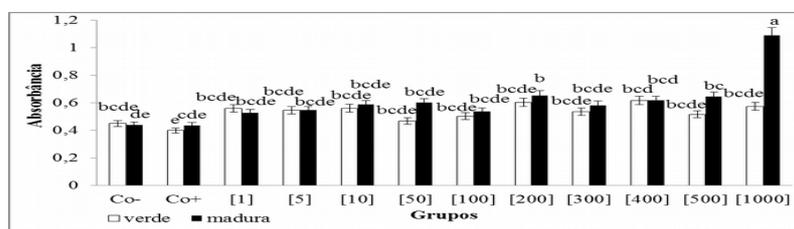
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da Figura 1 apresentam os valores médios de absorbância e desvios-padrões obtidos com as células HTC tratadas com os extratos etanólicos de carambolas verdes e maduras, no tempo de 24 horas. Os dados mostram que todas as concentrações do extrato de carambola verde foram estatisticamente semelhantes ao controle negativo, não apresentando efeito citotóxico.

Já para o extrato de carambola madura, as concentrações de 200 μ g/mL, 500 μ g/mL e 1000 μ g/mL apresentaram absorbâncias maiores e diferentes estatisticamente do controle negativo, o que indica estímulo da divisão celular destas concentrações avaliadas neste tempo.

A indução da divisão celular observada no extrato de carambola madura pode ser explicada pela grande quantidade de nutrientes contidos na carambola e o grande potencial antioxidante. Os estudos de Guéant et al. (2013) e Wang et al. (2014) mostram que a concentração de vitamina C está diretamente relacionada com o crescimento e multiplicação celular. Também, a estimulação das divisões celulares das células tratadas com extratos frutuosos está relacionada à existência de compostos bioativos presentes nos frutos, como vitaminas, compostos fenólicos, antioxidantes, dentre outros (RIZZON et al., 2007; RIZZON; MIELE, 2012).

Figura 1 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato tratadas por 24 horas com as concentrações dos extratos etanólicos brutos de carambola verde e madura.

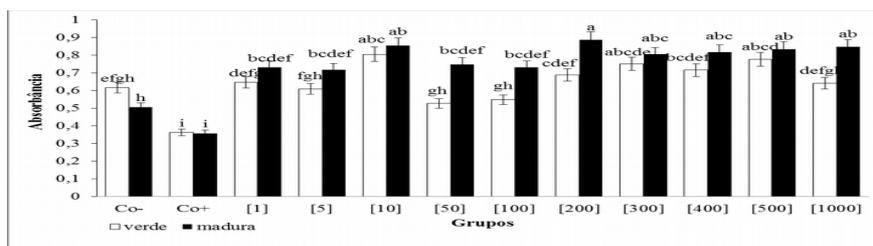


Co-: Controle Negativo; Co+: Controle Positivo; 2,0x10⁴ células por poço. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p<0,05).Fonte: Autora (2019).

No tempo de 48 horas (Figura 2) observou-se que as concentrações de 10 µg/mL e 500 µg/mL do extrato de carambola verde e todas as concentrações do extrato de carambola madura, foram diferentes do controle negativo neste tempo de avaliação, apresentando absorbâncias estatisticamente maiores e indução das divisões celulares das células tumorais. Resultado semelhante foi obtido por Düsman (2014), utilizando como tratamento o suco integral e natural de uvas convencionais e orgânicas e Rocha (2018), utilizando extratos de bagaço de uva, onde a viabilidade celular e a proliferação celular aumentaram no horário de 48 horas de tratamento, em células HTC. Logo, a grande quantidade de vitaminas e antioxidantes presentes na carambola contribuíram para a proliferação celular, como a maioria dos extratos de frutas citadas.

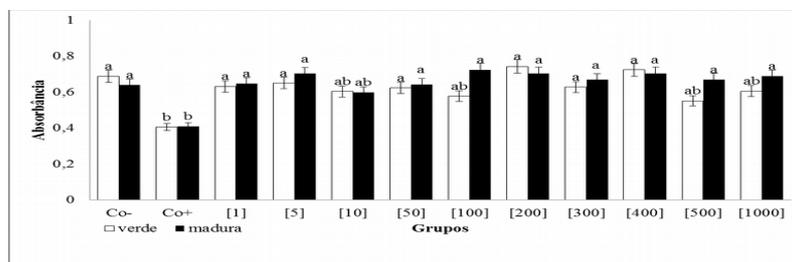
A Figura 3 apresentam os valores médios de absorbância e desvios-padrões obtidos com as células HTC tratadas com os extratos etanólicos de carambola verde e madura no tempo de 72 horas. A análise estatística mostrou que não houve diferenças entre as diferentes concentrações dos extratos etanólicos de carambola verde e madura com o controle negativo, indicando ausência de efeito citotóxico/antitumoral destes extratos ou efeito proliferativo celular.

Figura 2 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato tratadas por 48 horas com as concentrações dos extratos etanólicos brutos de carambola verde e madura.



Co-: Controle Negativo; Co+: Controle Positivo; 2,0x10⁴ células por poço. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p<0,05).Fonte: Autora (2019).

Figura 3 - Absorvância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato tratadas por 72 horas com as concentrações dos extratos etanólicos brutos de carambola verde e madura.



Co-: Controle Negativo; Co+: Controle Positivo; 2,0x10⁴ células por poço. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey (p<0,05).Fonte: Autora (2019).

CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo indicam estímulo da proliferação celular (tempos de 24 e 48 horas) ou nenhum efeito sobre as células HTC (72 horas) após contato com os extratos etanólicos de carambolas verdes e maduras. Os dados mostram que outros solventes devem ser avaliados com a fruta carambola, a fim de obter extratos mais eficientes em termos biológicos.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, D. R., LOCATELLI, C. *Avaliação da Atividade Antitumoral in vitro e Antimetastática in vivo do TetradecilGalato*. I SIPEX - Seminário integrado de pesquisa e extensão Universitária. Campinas. 2009.
- DÜSMAN, E. *Avaliação da ação citotóxica e mutagênica do iodo-131 e da acerola (malpighia glabra L.), e radioprotetora da fruta em relação ao radiofármaco, em doses diagnóstica e terapêutica, em tratamentos agudo e subcrônico, de ratos wistar*. Maringá: UEM, 2009. 223 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.
- FERREIRA, C. P. S. *Extração em meio aquoso e concentração por processos de membranas de fibras solúveis a partir do bagaço de uva branca*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Técnico Lisboa. Rio de Janeiro. 2013.

FRAGOSO, R. Carambola. **Forma Saudável.com**. 2013. Disponível em:
<<http://formasaudavel.com.br/carambola/>> Acesso em: 08/09/18.

GUÉANT, J. L.; CAILLEREZ-FOFOU, M.; BATTAGLIA-HSU, S.; ALBERTO, J. M.; FREUND, J. N.; DULLUC, I.; ADJALLA, C.; MAURY, F.; MERLE, C.; NICOLAS, J. P.; NAMOUR, F.; DAVAL, J. L. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. **Biochimie**, v. 95, p. 1033-1040, 2013.

MANTUANELLI, M. R.; MATSUMOTO, S. T.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. **Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and Baccharisdracunculifolia, by in vitro study with HTC cells**. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Toxicology in Vitro. Espirito Santo. 2015.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **JournalofImmunologicalMethods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

PALITO, G. F.; SILVA, C. F. G. 1, MENDES, M. P.; ALMEIRA, V. V.; ROCHA, C. L. M. S. C.; TONIN, L. T. D. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante de frutos de MorindacitrifoliaLinn (noni) cultivados no Paraná. **RevistaBrasileira de PlantasMedicinais**, v. 17, n.1, p. 59-66. 2015.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 45, 2007.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Analytical characteristics and discrimination of Brazilian commercial grape juice, nectar, and beverage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 93-97, 2012.

ROCHA, A. M. **Produção de extratos dos resíduos de indústria vinícola e sua avaliação antioxidante e citotóxica**. Trabalho de Conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão. 2018.

SIMONETTI, Ana Catarina. **Atividade Antitumoral e Toxicidade de Nanopartículas contendo o Ácido Fumarprotocetrárico isolado de Cladonia verticillaris (Líquen)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Recife. 2004.

WANG, J.; CAO, H.; XUE, X.; FAN, C.; FANG, F.; ZHOU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells in vitro. **Theriogenology**, v. 81, p. 545-555, 2014.