



# Produção e avaliação do efeito antiproliferativo do extrato do arilo de Maracujá

## *Production and evaluation of the antiproliferative effect of passion fruit aryl extract*

Israel Keller Silva\*, Elisângela Düsman<sup>†</sup>,  
Patricia Aline Bressiani<sup>‡</sup>, Maria Helene Giovanetti Canteri<sup>§</sup>, Ana Paula de Oliveira Schmitz<sup>¶</sup>,  
Guilherme Henrique Berton<sup>‡</sup>, Cláudio Roberto Novello<sup>#</sup>

### RESUMO

O maracujá possui cinco partes: o albedo, flavedo, o arilo carnoso, polpa e as sementes. O arilo carnoso apresenta benefícios à saúde humana, em função de seu conteúdo de compostos fenólicos. Assim, o objetivo do presente estudo foi extrair compostos hidrossolúveis do arilo carnoso autoclavado de maracujá e avaliar sua atividade citotóxica/antiproliferativa em células tumorais hepáticas humanas (HuH7.5). Para analisar o efeito das variáveis experimentais de extração, foi utilizado o delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>, com duas variáveis independentes (tempo e temperatura de extração). Os resultados obtidos mostraram que em 78,4 °C e 23,5 min foram determinadas as melhores condições de extração sólido-líquido, em termos de compostos fenólicos, sendo ambas as variáveis avaliadas estatisticamente significativas. A análise físico-química deste extrato mostrou seu caráter ácido, com 3,5 °Brix de sólidos solúveis, umidade de 8,41% e atividade antioxidante com 49,20% de inibição do DPPH. O teste do MTT com as células HuH7.5 mostrou que todas as concentrações (exceto a de 300 µg mL<sup>-1</sup>), nos três tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas) apresentaram efeito indutor da proliferação celular. Os dados indicam que outros solventes e/ou linhagens tumorais devem ser avaliadas, buscando identificar melhor atividade biológica.

**Palavras-chave:** arilo autoclavado, delineamento experimental, linhagem HuH7.5, maracujá, MTT.

### ABSTRACT

Passion fruit has five parts: the albedo, flavedo, the fleshy aril, pulp and the seeds. The fleshy aryl has benefits to human health, due to its content of phenolic compounds. Therefore, the objective of the present study was to extract water-soluble compounds from the autoclaved fleshy aryl of passion fruit and evaluate its cytotoxic/antiproliferative activity in human liver tumor cells (HuH7.5). To analyze the effect of the experimental extraction variables, the central composite rotational design 2<sup>2</sup> was used, with two independent variables (time and temperature of extraction). The results obtained showed that at 78.4 °C and 23.5 min the best conditions for solid-liquid extraction were determined, in terms of phenolic compounds, both variables being statistically significant. The physicochemical analysis of this extract showed its acid character, with 3.5 °Brix of soluble solids, 8.41% moisture and antioxidant activity with 49.20% DPPH inhibition. The MTT test with HuH7.5 cells showed that all concentrations (except for 300 µg mL<sup>-1</sup>), in the three evaluation times (24, 48 and 72 hours) had an inducing effect on cell proliferation. Data indicate that other solvents and/or tumor strains should be evaluated, seeking to identify better biological activity.

**Keywords:** autoclaved aryl, experimental design, HuH7.5 lineage, passion fruit, MTT.

\* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; [israelkeller@hotmail.com](mailto:israelkeller@hotmail.com)

<sup>†</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; [lisdusman28@gmail.com](mailto:lisdusman28@gmail.com)

<sup>‡</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; [patriciaab142536@gmail.com](mailto:patriciaab142536@gmail.com)

<sup>§</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; [canteri@utfpr.edu.br](mailto:canteri@utfpr.edu.br)

<sup>¶</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; [anaoliveiraec@gmail.com](mailto:anaoliveiraec@gmail.com)

<sup>‡</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; [guilhermehenriqueberton@gmail.com](mailto:guilhermehenriqueberton@gmail.com)

<sup>#</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; [crnovello@gmail.com](mailto:crnovello@gmail.com)



## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são usadas como medicamentos caseiros em regiões tradicionais, ou como matéria-prima para a produção de fitoterápicos e aplicadas para fins terapêuticos (FIRMO et al., 2011), com papel importante no apoio à saúde das pessoas (GEORGE et al., 2016).

O maracujá, pertencente à família Passifloraceae, por exemplo, é uma planta medicinal muito utilizada como sedativo para distúrbios de sono e ansiedade (ARANTES; LOPES; TIYO, 2017). O fruto possui cinco partes: albedo (mesocarpo), flavedo (exocarpo), o arilo carnoso (endocarpo), a polpa e as sementes (FAEP, 2020). Seus subprodutos (casca, sementes e arilo carnoso - endocarpo), além de apresentarem atividade antitumoral (MOTA et al., 2018; SILVA et al., 2012), contêm potencial benéfico a saúde, por causa dos carboidratos e proteínas, além de compostos fenólicos, importantes para as atividades antioxidantes, fibras solúveis e ácidos graxos (CANTERI et al., 2010; TUOPING et al., 2014).

A extração é um dos métodos mais empregados para isolamento de produtos ativos encontrados em plantas medicinais (PONTES et al., 2018). A extração sólido-líquido, por exemplo, com ajuda de solvente, ocorre quando os compostos solúveis do material sólido são extraídos por um solvente líquido. Métodos eficazes de extração devem melhorar a recuperação de compostos alvo, com pouca quantidade de degradação ou modificação de seu estado natural (GUINDANI et al., 2014).

Uma das formas de se avaliar a qualidade dos extratos obtidos é testar suas atividades biológicas. O teste de citotoxicidade do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 brometo de difenil tetrazólio), por exemplo, avalia o efeito tóxico de novos medicamentos, drogas e extratos em linhas celulares (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Assim, o objetivo do presente estudo foi produzir e avaliar os efeitos citotóxicos/antiproliferativos do extrato hidrossolúvel do arilo carnoso (endocarpo) autoclavado do maracujá, frente às células HuH7.5 (carcinoma hepático humano).

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Preparo do Arilo do Maracujá e dos Extratos

Os maracujás foram adquiridos no comércio local da cidade de Francisco Beltrão – Paraná. O endocarpo lavado foi seco em estufa de circulação de ar por 24 horas (até massa constante), na temperatura de 50 °C. Após, foi moído e o pó foi tamizado em peneira de 0,69 mm de abertura, seguido pelo tratamento em autoclave vertical durante 30 minutos a 120 °C, a fim de extrair maior quantidade de compostos fenólicos.

Para a extração sólido-líquido, foram adicionados 0,25 g do arilo carnoso moído e autoclavado do maracujá em 10 mL do solvente extrator (água Mili Q), sendo o processo realizado por infusão. A mistura foi mantida em banho ultrassônico, com uma agitação constante de 100 rpm na temperatura e no tempo de extração definidos pelo planejamento experimental composto central rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>. Em seguida, os extratos aquosos foram filtrados a vácuo através de filtro tecido sintético de trama fechada (poliéster).

A análise estatística da variável resposta de concentração de compostos fenólicos foi realizada pelo teste de variância ANOVA para estimar os parâmetros estatísticos e avaliar a predição ou não do modelo matemático. Os coeficientes do modelo foram analisados pelo teste t de Student a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Além disso, a análise dos resultados foi feita pela distribuição de resíduos e superfície de resposta.



## 2.2 Determinação de Compostos Fenólicos, Atividade Antioxidante e Análises Físico-Químicas

Para a determinação de teor de fenólicos totais dos extratos infundidos do endocarpo do maracujá foi feito o ensaio colorimétrico Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), com adaptações e, os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por g de amostra ( $\text{mg AG g}^{-1}$ ).

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos do arilo carnoso do maracujá foi utilizado o método do sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com Brand-Williams (1995). A determinação da atividade antioxidante foi feita por meio da porcentagem de inibição (%I) em relação ao controle, conforme a Eq. (1), em que (Ac) representa a absorbância do controle DPPH e (Aa) representa a absorbância da amostra.

$$\%I = \frac{(Ac - Aa)}{Ac} * 100 \quad (1)$$

As análises físico-químicas do extrato do arilo carnoso do maracujá foram realizadas seguindo as técnicas sugeridas pelo manual de Métodos Físico-químicos para análises de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008), determinando-se: pH, acidez total titulável e sólidos solúveis. Também foi determinada a composição centesimal aproximada do endocarpo do maracujá, estimada pelo teor de umidade, por secagem direta a 105 °C durante 48 horas.

## 2.3 Teste de Citotoxicidade/Atividade Antitumoral

O ensaio de citotoxicidade/atividade antitumoral foi realizado pelo MTT de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983). Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas  $3,0 \times 10^4$  células HuH7.5 (derivadas do carcinoma hepatocelular). Após estabilização por 24 horas, o meio de cultura foi descartado e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de meio completo com os tratamentos: meio de cultivo (controle negativo - CO-), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS - 150  $\mu\text{M}$ ), (controle positivo - CO+) e tratamentos com o extrato aquoso autoclavado do endocarpo do maracujá, diluído em meio de cultura, nas concentrações finais de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Após 24, 48 e 72 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura acrescido de MTT (0,364  $\text{mg mL}^{-1}$ ). As placas foram incubadas por mais quatro horas antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitora de microplacas (Thermo Plate) a 560 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (*one way ANOVA*), seguida do teste de Dunnet, pelo *software Action Stat*. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de *p* menor que 0,05.

## 3 RESULTADOS

Os resultados das concentrações dos compostos fenólicos, obtidos pela realização do planejamento experimental com as variáveis independentes tempo de extração e temperatura, são mostrados na Tab. 1. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido para o ajuste do modelo matemático proposto aos dados experimentais



indicou uma explicação dos dados de 78,76%. Analisando os resultados obtidos, foi possível observar que o modelo em estudo é válido, visto que o  $F_{\text{calculado}}$  foi de 25,95, sendo este maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  que foi de 2,71.

**Tabela 1 – Teor médio e desvio padrão de compostos fenólicos obtidos para cada ensaio do delineamento experimental com duas variáveis independentes.**

Ensaio	Variáveis independentes		Variável dependente			
	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min)	Compostos Fenólicos (mg g <sup>-1</sup> )			Média ± desvio-padrão
			1	2	3	
1	21,6	6,5	14,43	14,23	14,17	14,34 ± 0,15
2	21,6	23,5	14,65	14,28	14,28	14,40 ± 0,21
3	78,4	6,5	16,84	16,50	16,58	16,64 ± 0,18
4	78,4	23,5	18,06	17,90	17,84	17,93 ± 0,11
5	10,0	15,0	13,65	13,80	13,95	13,80 ± 0,15
6	90,0	15,0	16,35	15,87	15,80	16,01 ± 0,30
7	50,0	3,0	17,47	17,35	17,46	17,43 ± 0,07
8	50,0	27,0	16,32	15,98	15,57	15,96 ± 0,37
9 C	50,0	15,0	16,68	16,61	16,47	16,59 ± 0,11
10 C	50,0	15,0	15,35	15,39	15,32	15,35 ± 0,03
11 C	50,0	15,0	17,10	16,73	16,58	16,91 ± 0,26

Fonte: Autoria Própria (2021).

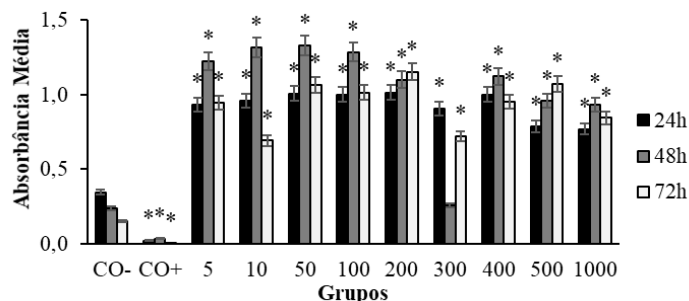
A análise da superfície de resposta mostrou que ocorreu um aumento na concentração de compostos fenólicos para temperaturas de extração mais elevadas (acima de 50 °C) e que a variação do tempo de extração, dentro da faixa avaliada, não representa significativa alteração da concentração de compostos fenólicos, estando em todos os casos em níveis elevados destes compostos. De maneira geral, pela análise feita na superfície, foi possível concluir que em temperaturas na faixa de 60 a 90 °C e nos menores e maiores tempos de extração, observam-se as maiores concentrações de compostos fenólicos. Assim, foram utilizados os valores de 78,4 °C e 23,5 min para temperatura e tempo de extração, respectivamente, pois estes apresentaram os valores de máxima extração de compostos fenólicos indicados nos ensaios delineados do planejamento para garantir que o tempo de extração fosse adequado, visto que este não indicou influência expressiva na eficiência da extração aquosa do arilo autoclavado do maracujá.

A atividade antioxidante do extrato aquoso do arilo carnoso autoclavado do maracujá apresentou valor de 49,20% de atividade de sequestro do radical livre DPPH. Com relação aos resultados físico-químicos do extrato do arilo carnoso autoclavado do maracujá, nota-se pelo valor do pH seu caráter ácido (3,97). Na análise de acidez total, o extrato do endocarpo autoclavado apresentou valor de 10,54% em ácido cítrico. Com relação aos sólidos solúveis, pode-se observar baixos índices (3,50 °Brix), explicados, por exemplo, devido a baixas temperaturas ou pouca luminosidade no desenvolvimento dos frutos. A porcentagem de umidade encontrada no arilo autoclavado foi de 8,41%, sendo este resultado com pequena diferença do valor relatado por Canteri et al. (2010) (6,0%), que também avaliou a umidade do arilo não autoclavado do maracujá.

Os dados da Fig. 1 apresentam os valores médios de absorvância e desvios-padrões obtidos com as células de carcinoma hepatocelular HuH7.5 tratadas com as diferentes concentrações do extrato aquoso do arilo carnoso autoclavado do maracujá nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os dados mostram que todas as concentrações (exceto a concentração de 300 µg mL<sup>-1</sup> no tempo de 48 horas) do extrato do arilo autoclavado do maracujá apresentaram absorvâncias médias maiores e diferentes estatisticamente do controle negativo, o que indica estímulo da divisão celular destas concentrações avaliadas nos três tempos.



**Figura 1 – Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado humano HuH7.5 tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações do extrato aquoso do arilo carnosu autoclavado do maracujá.**



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo;  $3,0 \times 10^4$  células por poço.

\* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet,  $p < 0,05$ ).

Fonte: Autoria Própria (2021).

#### 4 CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou bons resultados para a extração de compostos fenólicos do arilo carnosu (endocarpo) autoclavado da *Passiflora edulis f. flavicarpa* na temperatura de 78,4 °C e no tempo de 23,5 min. A avaliação físico-química identificou a acidez do arilo e atividade antioxidante do endocarpo do maracujá. Nos ensaios com células HuH7.5 humanas, praticamente todas as concentrações do extrato do endocarpo autoclavado do maracujá apresentaram absorbâncias médias maiores e diferentes estatisticamente do controle negativo, o que indica estímulo da divisão celular destas concentrações e tempos avaliados.

Assim, os dados do presente trabalho indicam que outras linhagens tumorais e normais devem ser avaliadas, buscando identificar melhor atividade biológica do extrato aquoso do arilo carnosu autoclavado do maracujá produzido.

#### AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a instituição de ensino Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

#### REFERÊNCIAS

ARANTES, V. P.; LOPES, M. W.; TIYO, R. Utilização de passiflora *incarnata* no tratamento da ansiedade. **Revista UNINGÁ**, v. 29, n. 2, p. 81-86, jan. 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 22, p. 25-30. 1995.

CANTERI, M. H.; SCHEER, A.; PETKOWICZ, C.; GINIES, C.; RENARD, C.; WOSIACKI, G. Physicochemical composition of the yellow passion fruit pericarp fractions and respective pectic substances. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 49, n. 3, p. 113-122, jul. 2010.

FAEP - Federação da Agricultura do Estado do Paraná. Cartilha de Classificação do Maracujá. Comissão Técnica de Agricultura. Disponível em:



<<http://www.faepr.com.br/comissoes/frutas/cartilhas/frutas/maracuja.htm>>. Acesso em: 13 de junho de 2020.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, p. 90-95, dez. 2011.

GEORGE, D. R.; EDRIS, W.; HANDSON, R.; GILMAN, F. Medicinal plants – next generation. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 16-22, jan. 2016.

GUINDANI, M. et al. Estudo do processo de extração de compostos fenólicos e antocianinas totais do *Hibiscus sabdariffa*. **COBEQ 2014 – XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 1-7, out. 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008.

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, dez. 1983.

MOTA, N. S. R. S. et al. F. *In vivo* antitumor activity of by-products of *Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg. Rich in médium and long chain fatty acids evaluated through oxidative stress markers, cell cycle arrest and apoptosis induction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 557-565, ago. 2018.

NACHBAR, F. R. F. **Compostos bioativos presentes em cultivares de maracujá**. 2013. 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 2013.

PONTES, E. D. S. et al. Diferentes Métodos de Extração de Compostos Bioativos de Vegetais. **International Journal of Nutrology**, v. 11 (S 01), p. S24-S327, set. 2018.

SILVA, D. C. et al. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Journal Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 139-145, jan. 2012.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Journal Methods in Enzimology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

TUOPING, L.; SUHONG, L.; YINPING, D.; RUGANG, Z.; YONGHUI, L. Antioxidant activity of penta-oligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglycerides synthesis in mice fed with a high-fat-diet. **Food Chemistry**, v. 145, p. 335-341, fev. 2014.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G.J.L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, p. 237-245, mar. 2011.