



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

## Avaliação do efeito citotóxico/antitumoral do extrato aquoso de carambolas verdes e maduras

### *Evaluation of the cytotoxic/antitumor effect of the aqueous extract of green and mature carambola*

Ágatha Giovanna Fragoso\*, Elisângela Düsman<sup>†</sup>, Patricia Aline Bressiani<sup>@</sup>, Mecshim Marie Cadoná<sup>#</sup>, Irede Angela Lucini Dalmolin<sup>§</sup>, Lilian Tatiani Düsman Tonin<sup>&</sup>

#### RESUMO

Nos últimos anos a medicina tradicional vêm sendo explorada como uma alternativa nos tratamentos de doenças, entre elas o câncer. A carambola (*Averrhoa carambola*) é um dos frutos com potencial medicinal pois possui altos teores de vitamina C, antioxidantes e compostos fenólicos responsáveis por sua atividade biológica. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade citotóxica/antitumoral dos extratos aquosos dos frutos verdes e maduros da caramboleira em células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC). As células HTC foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos aquosos (5, 10, 50, 100, 300, 400, 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. Os dados de absorbância obtidos indicaram citotoxicidade das carambolas verdes e maduras, com destaque para a concentração de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato da carambola verde que apresentou efeito citotóxico nos três tempos de avaliação e, as concentrações de 300 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato da carambola madura, que foi citotóxico nos tempos de 24 e 48 horas. No entanto, sugere-se que novas doses de extrato sejam testadas, assim como diferentes solventes, pois o fruto possui inúmeros benefícios podendo ser utilizado como fármaco.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade, HTC, *Averrhoa*, MTT.

#### ABSTRACT

In recent years, traditional medicine has been explored as an alternative in the treatment of diseases, including cancer. Carambola (*Averrhoa carambola*) is one of the fruits with medicinal potential because it has high levels of vitamin C, antioxidants and phenolic compounds responsible for its biological activity. Thus, the aim of this study was to evaluate the cytotoxic/antitumor activity of aqueous extracts of unripe and ripe fruits of star fruit on liver tumor cells of *Rattus norvegicus* (HTC). HTC cells were treated with different requirements of aqueous extracts (5, 10, 50, 100, 300, 400, 500 and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) for periods of 24, 48 and 72 hours. The absorbance data obtained indicated cytotoxicity of green and mature star fruit, with emphasis on the concentration of 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of the green star fruit extract, which showed a cytotoxic effect in the three evaluation times, and concentrations of 300 and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of the extract of mature carambola, which was cytotoxic at times of 24 and 48 hours. However, it is suggested that new doses of extract be tested, as well as different solvents, as the fruit has numerous benefits and can be used as a drug.

**Keywords:** Cytotoxicity, HTC, *Averrhoa*, MTT.

\* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; agathagragoso@gmail.com

<sup>†</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; edusman@utfpr.edu.br

<sup>@</sup> Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; patriciaaab142536@gmail.com

<sup>#</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; mecshimmk@hotmail.com

<sup>§</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; irededalmolin@utfpr.edu.br

<sup>&</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; liliandusman@utfpr.edu.br



## 1 INTRODUÇÃO

Uma dieta composta por frutas e vegetais é, comprovadamente, benéfica à saúde com grande potencial de prevenir doenças crônicas, cardiovasculares e alguns tipos de cânceres. Isso se deve às propriedades antioxidante, antitumoral, antimicrobiana e antimutagênica dos compostos vegetais (VAL, 2014). Quanto ao interesse na terapêutica do câncer, nos últimos anos a quimioterapia tem demonstrado notáveis resultados no combate à doença controlando a proliferação celular. No entanto, faz-se necessária a descoberta de fármacos que possuam uma abordagem menos agressiva no tratamento. Nesse sentido que a pesquisa por produtos naturais é cada vez mais incentivada (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

A caramboleira, do gênero *Averrhoa* (Oxalidaceae), é uma das espécies de interesse econômico e com potencial medicinal. Ela cresce em regiões tropicais e subtropicais e seu fruto, a carambola, pode ser dividida em dois grupos principais: ácido e adocicado, sendo o primeiro com grande presença de ácido oxálico (YASAWARDENE et al., 2010; VAL, 2014). O fruto é rico em antioxidantes e vitamina C, podendo retardar o envelhecimento celular. Na medicinal tradicional, diferentes partes da planta, como polpa, folhas, flores, são utilizadas nos tratamentos de tosse, dores de garganta, úlceras bucais, dores de dente, náusea e diarreia (PROVASI et al., 2008; SAGUIR et al., 2013). Além disso, destaca-se em sua composição a presença de compostos fenólicos, como os flavonoides e taninos responsáveis por sua atividade biológica (VAL, 2014).

Apesar disso, poucos estudos investigaram a atividade antitumoral do fruto da caramboleira que é a parte mais consumida pela população na forma in natura e na culinária. Além disso, muitos desses estudos se deram com extratos hidroalcoólicos e metanólicos. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade citotóxica/antitumoral do extrato aquoso de carambolas verdes e maduras em células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

As carambolas, verde e madura, foram adquiridas em frutarias na cidade de Francisco Beltrão, da marca Sítio ShimaZaki. Os frutos foram triturados em liquidificador e, então, foram adicionadas 10 g da polpa de carambola verde ou madura em 50 mL do solvente extrator (água). Estes foram mantidos em agitação magnética por 2 horas ao abrigo de luz. Após, os extratos foram filtrados em papel filtro (PALIOTO et al., 2015), diluídos em um balão volumétrico de 100 mL, com água, para se obter extratos na concentração final de 100 mg. mL<sup>-1</sup>. Após, a solução foi liofilizada para a obtenção do extrato final.

Para o preparo da solução a ser testada no teste citotoxicidade/atividade antitumoral preparadas as concentrações de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg do extrato por mL de meio de cultura suplementado com soro bovino fetal.

As células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 15% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em estufa tipo BODa 37 °C.

Para realizar o teste da atividade citotóxica/antitumoral foi utilizado o ensaio MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide], de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultivo de 96 poços onde, em cada poço, foram semeadas 2,0x10<sup>4</sup> células de HTC, com exceção do poço de controle sem célula (branco). Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio completo para os grupos: controle negativo (CO<sup>-</sup>) (meio de cultura), controle positivo (CO<sup>+</sup>) com o agente citotóxico metil metanossulfanato (MMS 500 µM) e os tratamentos com as diferentes concentrações do extrato de carambola verde e madura.



As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após esse tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura não suplementado, acrescido de MTT (0,167 mg. mL<sup>-1</sup>). A placa foi incubada novamente por mais 4 horas, na sequência, foi descartado o meio contendo MTT e aos poços foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. A leitura das absorbâncias foi realizada em uma leitora de microplaca (Thermo Plate) a 560 nm.

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias submetidos ao teste de normalidade, à análise de variância (one way ANOVA), seguida do teste de comparação de médias de Tukey. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de  $p$  foi menor que 0,05.

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

$$VC = \frac{(ABS_T)}{(ABS_{CO-})} \quad (1)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

$ABS_T$  = Absorbância do tratamento;

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

### 3 RESULTADOS

Os dados da Figura 1 apresentam os resultados das absorbâncias médias do tratamento com os extratos aquosos das carambolas verdes e maduras, no tempo de 24 horas. A análise estatística demonstrou que as concentrações 1 e 10 µg mL<sup>-1</sup> do extrato de carambola verde apresentaram absorbâncias médias estatisticamente menores que a do controle negativo, ou seja, apresentaram efeito citotóxico sobre as células tumorais HTC. Por outro lado, as demais concentrações do extrato da carambola verde não apresentaram absorbâncias médias estatisticamente diferente ao do controle negativo e foram semelhantes entre si, mostrando independência da concentração testada.

Para o extrato de carambola madura, as concentrações de 10, 200, 300 e 1000 µg mL<sup>-1</sup> apresentaram absorbâncias médias estatisticamente menores que a do controle negativo, ou seja, apresentaram citotoxicidade nas células tumorais. Por outro lado, as demais concentrações do extrato da carambola madura não apresentaram absorbâncias médias estatisticamente diferente ao do controle negativo e foram semelhantes entre si, mostrando independência da concentração testada.

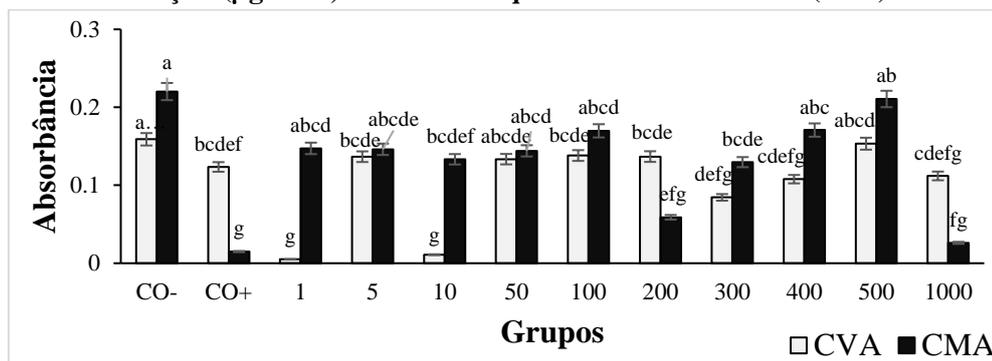
O efeito citotóxico/antitumoral observado dos extratos aquoso da carambola verde e madura pode ser explicado devido a carambola verde e madura do presente estudo possuir compostos fenólicos (flavonoides/taninos/fenóis), conforme comprovado por Oliveira et al. (2017).

No tempo de 48 horas (Figura 2) observou-se que apenas a concentração de 1 µg mL<sup>-1</sup> do extrato de carambola verde, permaneceu com a absorbância média estatisticamente menor que a do controle negativo, ou seja, apresentou efeito citotóxico sobre as células tumorais. Entretanto, todas as concentrações maiores 1 µg mL<sup>-1</sup>, não foram diferentes do controle negativo no tempo avaliado, e foram semelhantes entre si, mostrando independência da concentração testada. Estes resultados devem estar relacionados ao maior teor de antioxidantes na carambola verde, conforme mostrado por Oliveira et al. (2017) com as mesmas carambolas avaliadas no presente estudo.

As viabilidades celulares das concentrações do extrato de carambola verde de 10, 300, 400, 500 e 1000 µg mL<sup>-1</sup> no tempo de 48h, foram superiores a 100%, ou seja, ocorreu a indução das divisões celulares das células tumorais. Para o extrato de carambola madura também ocorreu um aumento nas viabilidades celulares das

concentrações de 1, 10, 50, 100, 200, 300 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no tempo de 48 h, atingindo valores acima de 100%, indicando a proliferação celular. Segundo os estudos de Wang et al. (2014), a presença de vitamina C está diretamente relacionada ao crescimento e multiplicação celular. Resultado semelhante foi obtido por Mecshim (2019) avaliando extratos etanólicos das mesmas carambolas verdes e maduras, onde a viabilidade celular e a indução à divisão celular foram maiores no período de 48 horas de tratamento em células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC).

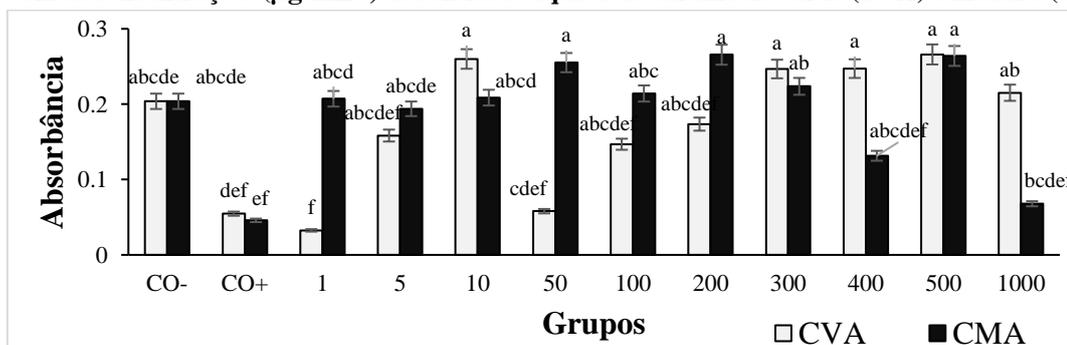
**Figura 1 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato (HTC) tratadas por 24 horas com as concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos aquoso de carambola verde (CVA) e madura (CMA).**



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo;  $2,0 \times 10^4$  células por poço. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autoria Própria (2021).

**Figura 2 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato (HTC) tratadas por 48 horas com as concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos aquoso de carambola verde (CVA) e madura (CMA).**



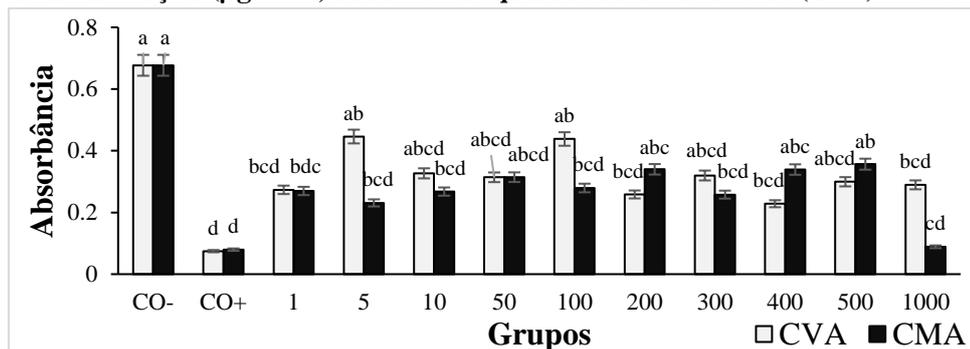
CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo;  $2,0 \times 10^4$  células por poço. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autoria Própria (2021).

A Figura 3 apresentam os valores médios de absorbância obtidos com as células HTC tratadas com os extratos aquosos de carambola verde e madura no tempo de 72 horas. A análise estatística mostrou que as concentrações 1, 200, 400 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato de carambola verde apresentaram absorbância médias estatisticamente menores que a do controle negativo, indicando assim efeito citotóxico/antitumoral sobre as células tumorais. Inclusive as viabilidades celulares das concentrações neste tempo variaram de 33,73 a 65,90%. Já para extrato de carambolas madura as concentrações 1, 5, 10, 100, 300 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentaram absorbâncias médias estatisticamente menor que a do controle negativo, ou seja, apresentaram

citotoxicidade nas células tumorais. Além disso, as viabilidades celulares das concentrações neste tempo variaram entre 13,12 e 52,66%. Ao comparar o efeito citotóxico da carambola verde e madura, pode-se observar que no tempo de 72 horas a carambola madura apresentou viabilidades celulares mais baixas do que a carambola verde.

**Figura 3 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato (HTC) tratadas por 72 horas com as concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos extratos aquoso de carambola verde (CVA) e madura (CMA).**



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo;  $2,0 \times 10^4$  células por poço. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autoria Própria (2021).

#### 4 CONCLUSÃO

Por meio desse estudo é possível observar que os extratos aquosos de carambolas verdes e maduras apresentaram efeito citotóxico para as células tumorais HTC, com destaque para a concentração de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato da carambola verde que apresentou efeito citotóxico nos três tempos de avaliação e, as concentrações de 300 e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato da carambola madura, que foi citotóxico nos tempos de 24 e 48 horas. Os dados obtidos indicam que outros solventes devem ser avaliados a fim de obter extratos mais eficientes. Assim como, a verificação do seu efeito em doses maiores e em diferentes tipos células, já que é um fruto com potencial farmacêutico devido aos seus inúmeros benefícios.

#### REFERÊNCIAS

- VAL, E. B. **Estudo de padronização de extratos de folhas da caramboleira (*Averrhoa carambola* L.) na pesquisa e desenvolvimento de medicamento antimicrobianos.** São Luís: UFMA, 56 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente), Universidade Federal do Maranhão, 2014.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.**, 2 (1), 47-58. 30 de Agosto, 2010.
- YASAWARDENE, P.; JAYARAJAH, U.; ZOYSA, I.; SENEVIRATNE, S. L. Mechanisms of star fruit (*Averrhoa carambola*) toxicity: A mini-review. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 187, p. 198-202, 2010.



- PROVASI, M.; OLIVEIRA, C. E. DE; MARTINO, M. C.; PESSINI, L. G.; BAZOTTE, R. B.; GARCIA CORTEZ, D. A. Avaliação da toxicidade e do potencial antihiperlipêmico da *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 23, p. 665-669, 6 maio 2008.
- SAGUIR, S. A. M.; SADIKUN, A.; KHAW, K.; MURUGAIYAH, V. Star fruit (*Averrhoa carambola* L.): from traditional uses to pharmacological activities. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas 12 (3)**, p. 209-219, 2013.
- PALIOTO, 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 *Morindacitrifolia* Linn (noni) cultivados no Paraná. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n.1, p. 59-66, 2015.
- 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.
- OLIVEIRA, T. F. V.; HIRATA, P.; DÜSMAN, E.; TONIN, L.T.D. Determinação de fenóis totais, flavonoides e capacidade antioxidante dos frutos de carambola (*Averrhoa carambola* L.). In: **Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2017, Campinas-SP. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2017.
- 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.
- MECSHIM, C. M. **Extração sólido-líquido de compostos da *Averrhoa carambola* L. e avaliação de sua atividade citotóxica**. Trabalho de Conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão. 2019.