



Avaliação do efeito citotóxico/antitumoral do extrato hidrometanólico de gengibre

Evaluation of the cytotoxic/antitumor effect of hydroethanolic extract of ginger

Sabrina Ishikawa*, Elisângela Düsman†, Patrícia Aline Bressiani‡, Danielli Andrea Nardino§, Rúbia Michele Suzuki®, Carolina Casagrande Sipoli#, Lilian Tatiani Düsman Tonin\$

RESUMO

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e, seu tratamento mais recorrente é a quimioterapia. Esta apresenta diversos efeitos colaterais, tais como náuseas, queda de cabelo, fraqueza, ganho ou perda de peso. À vista disso, o gengibre (*Zingiber officinale roscoe*) apresenta-se como um fitoterápico, exercendo atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antioxidante e antitumoral. Através do presente estudo realizou-se o teste do MTT para averiguar a citotoxicidade do extrato hidroetanólico (EtOH:H₂O 70:30 (v/v)) de gengibre para as células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC) e células normais de rim de macaca (LLC-MK2). Foram testadas as concentrações de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg mL⁻¹ nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O composto apresentou-se ser citotóxico sobretudo para células cancerígenas, visto que foi citotóxico apenas para as células HTC e não para as células LLC-MK2. Sendo assim, o *Zingiber officinale roscoe*, por ser um alimento acessível, popular e um antitumoral eficiente, é um potencial recurso terapêutico.

Palavras-chave: Câncer, gengibre, citotoxicidade.

ABSTRACT

Cancer is the main public health problem in the world, and its most used treatment is chemotherapy. It has several side effects such as nausea, hair loss, weakness, and gain or loss of weight. In view of this, ginger (*Zingiber officinale roscoe*) presents itself as an herbal medicine, exerting anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antioxidant, and antitumor activity. Through the present study, the MTT test was performed to investigate the cytotoxicity of the hydroethanolic extract (EtOH:H₂O 70:30 (v/v)) of ginger to the liver tumor cells of *Rattus norvegicus* (HTC) and normal monkey kidney cells (LLC-MK2). Concentrations of 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 and 1000 µg mL⁻¹ were tested at times of 24, 48 and 72 hours. The compound was shown to be cytotoxic mainly to cancer cells, as it was cytotoxic only to HTC cells and not to LLC-MK2 cells. Thus, *Zingiber officinale roscoe*, being an accessible, popular and efficient antitumor food, is a potential therapeutic resource.

Keywords: Cancer, ginger, cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a incidência e mortalidade de pessoas com câncer têm crescido mundialmente, e essa doença é considerada o principal problema de saúde pública no mundo

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; sabrinaishikawa1811@gmail.com

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

‡ Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; patriciaaab142536@gmail.com

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; dani-nardino@hotmail.com

@ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; rubiasuzuki@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; liliandusman@utfpr.edu.br

\$ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; liliandusman@utfpr.edu.br



(INCA, 2019). A quimioterapia é o modo mais comumente utilizado para o tratamento do câncer, que consiste no ataque às células do paciente, sejam elas normais ou cancerígenas. Sendo assim, há efeitos colaterais protuberantes, por exemplo, náuseas, queda de cabelo, fraqueza, ganho ou perda de peso (DA CRUZ; ROSSATO, 2015).

A fitoterapia consiste no tratamento de doenças por meio do uso de plantas medicinais. É menos agressiva, e mais acessível e viável economicamente, logo, possui um grande potencial como recurso terapêutico (WALDENORA et al., 2018).

O gengibre (*Zingiber officinale roscoe*), tem origem do sudeste asiático, mais especificamente da Índia, e tornou-se destaque como fitoterápico; visto que, possui componentes com efeitos benéficos para saúde. Tais como: anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral, antioxidante e antitumoral (MAO et al., 2019).

É uma especiaria muito popular na culinária, possui aroma forte e sabor picante. A parte utilizada dessa espécie são os rizomas: caules horizontais, visto que o gengibre não dispõe de raízes e sim desses rizomas (RIBAS-SILVA, 2013). É constituído por dois grupos: os óleos voláteis e os compostos pungentes não-voláteis, onde concentram-se a maior quantidade de bioativos, como por exemplo, os compostos fenólicos (SHUKLA; SINGH, 2007).

Shukla e Singh (2007) salientaram que países do sudeste da Ásia apresentaram menores índices de câncer quando comparados aos da Ásia ocidental, correlacionando-os com a culinária, de modo que alimentos, como o próprio gengibre, previnem o desencadeamento do processo de carcinogênese. Dessa forma, seu efeito antitumoral pode ser proveitoso para o tratamento de câncer.

O teste de MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide] consiste em avaliar a atividade metabólica das células, por um processo de redução. Conforme as células vivas (metabolicamente ativas) reduzem o MTT, há a mudança de coloração do mesmo para roxo. Após sua aplicação, é feito a colorimetria para obter as absorvâncias de cada concentração, ou seja, o quão tóxico foi o composto em questão (VAN MEERLOO et al., 2011; ICB, 2019).

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a atividade citotóxica/antitumoral do extrato de gengibre através do teste de citotoxicidade em células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC) e células normais de rim de macaco (LLC-MK2).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o preparo da solução a ser testada no teste de citotoxicidade/atividade antitumoral/antiproliferativa foram pesadas 4 mg do extrato hidroetanólico (EtOH:H₂O 70:30 (v/v)) de gengibre. Este extrato foi diluído, com o auxílio de vórtex, em 1 mL de meio de cultura. Desta solução foram preparadas as seguintes concentrações teste: 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg mL⁻¹ de meio de cultura suplementado com soro bovino fetal.

As células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, e as células normais de rim de *Macaca mullata* (LLC-MK2), foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo 10 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e incubadas em estufa tipo BOD a 37 °C com 5% de CO₂.

Para realizar o teste da atividade citotóxica/antitumoral/antiproliferativa foi utilizado o ensaio MTT, 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 2,0x10⁴ células HTC ou 1,0x10⁵ células LLC-MK2, 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⁻) (meio de cultura), controle



positivo (CO⁺) com o agente citotóxico metil metanossulfanato (MMS 500 µM) e os tratamentos com as diferentes concentrações do extrato.

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⁻¹). A placa foi incubada novamente por mais 4 horas e, 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 492 nm.

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (one way ANOVA), seguido do teste de Dunnet, com o uso do programa Action Stat. 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 Eq. (1).

$$VC = \left(\frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

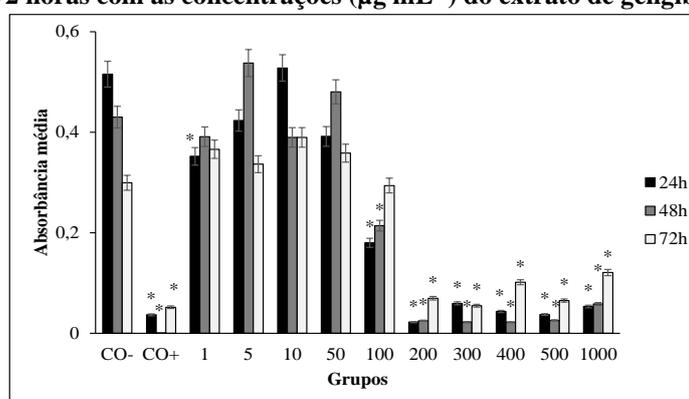
ABS_T = Absorbância do tratamento;

ABS_{CO-} = Absorbância do controle negativo.

3 RESULTADOS

Os dados da Figura 1 apresentam os resultados das absorbâncias médias dos tratamentos das células tumorais de fígado (HTC) com o extrato de gengibre, pelo teste de citotoxicidade/atividade antitumoral/antiproliferativa. A análise estatística mostra que as concentrações acima de 200 µg mL⁻¹, nos três tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas), foram citotóxicas, com absorbâncias médias estatisticamente menores que a do controle negativo. As concentrações de 1 µg mL⁻¹ (24 horas) e 100 µg mL⁻¹ (24 e 48 horas) também foram citotóxicas para as células HTC. Além disso, as viabilidades celulares (Tabela 1) das concentrações a partir de 200 µg mL⁻¹ variaram de 4,27 a 11,54% (24 horas), 5,06 a 13,55% (48 horas) e 18,29 a 40,34% (72 horas). A atividade antioxidante do gengibre pode ter atuado diminuindo o estresse oxidativo gerado pelas próprias modificações das células tumorais e, assim, desempenhando a atividade citotóxica/antitumoral nas células HTC.

Figura 1 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato (HTC) tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (µg mL⁻¹) do extrato de gengibre.



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

Fonte: Autoria Própria (2021).



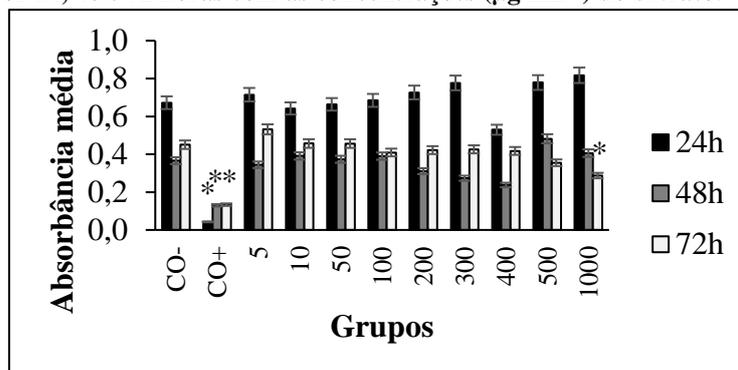
Tabela 1 - Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado de rato (HTC), tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato de gengibre, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.

Grupos	Célula HTC		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	7,08	0,27	17,26
CS	68,30	90,93	122,27
5	82,12	125,00	112,42
10	102,40	90,64	130,18
50	75,99	111,71	119,71
100	34,92	49,77	98,13
200	4,27	5,76	23,22
300	11,54	5,12	18,29
400	8,39	5,06	33,91
500	7,18	5,93	21,71
1000	10,33	13,55	40,34

Fonte: Autoria Própria (2021).

Estudos fitoquímicos demonstram que o gengibre é rico em 6-gingerol e shogaol. Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, como propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (YOUNG et al., 2005; DUGASANI et al., 2010). De acordo com Radhakrishnan et al. (2014), o 6-gingerol desempenhou efeito citotóxico e antiproliferativo em células de câncer de cólon humano, enquanto as células normais do cólon não foram afetadas. Este composto pode estar constituído no extrato de gengibre do presente estudo, sendo assim, foi possível observar resultado semelhante, onde o gengibre apresentou efeito citotóxico nas concentrações a partir $200 \mu\text{g L}^{-1}$ em células tumorais de fígado de rato em todos os tempos (24, 48 e 72 horas) (Figura 1), entretanto nas células normais de rim de macaco apenas a maior concentração ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) do extrato de gengibre, no tempo de 72 horas (Figura 2) apresentou efeito citotóxico. Além disso, pode-se notar que nas células normais ocorreu uma proliferação celular em todos os tempos, chegando a uma viabilidade de celular (Tabela 2) de 121,55% ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) em 24 horas, 131,63% ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) em 48 horas e 117,98% ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em 72 horas.

Figura 2 - Absorbância média e desvio-padrão de células normais de rim de macaco (LLC-MK2) tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato.



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

Fonte: Autoria Própria (2021).



Tabela 2 - Percentual de viabilidade de células (VC) normais de rim de macaco (LLC-MK2), tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato de gengibre, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.

Grupos	Célula LLC-MK2		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	6,32	35,52	29,63
5	106,31	94,13	117,98
10	95,49	106,83	101,39
50	98,72	102,05	101,33
100	101,83	106,63	90,84
200	108,06	84,90	93,62
300	115,57	74,68	94,56
400	78,76	64,94	92,67
500	115,87	131,63	78,80
1000	121,55	110,86	63,76

Fonte: Autoria Própria (2021).

4 CONCLUSÃO

O *Zingiber officinale roscoe* apresentou ser citotóxico para células tumorais de fígado de rato (HTC) para concentrações acima de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Não teve a mesma atividade em células normais de rim de macaco (LLC-MK2), apenas uma leve citotoxicidade para a maior concentração e no tempo de avaliação de 72 horas. O presente estudo atestou a atividade antitumoral já indicada na literatura, todavia, em diferentes linhagens celulares.

Por conseguinte, esse composto apresenta um potencial notável como antitumoral, visto que induz a apoptose celular sobretudo de células cancerígenas. É um alimento acessível e popular, se apresentando como um vantajoso recurso terapêutico em um panorama futuro.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade de participar do Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica. À Prof^ª Dr^ª Lilian Tatiani Dusman Tonin da Universidade Tecnológica Federal do Paraná por ceder gentilmente o extrato hidroetanólico de gengibre e ao Prof. Dr. Wander Pavanelli da Universidade Estadual de Londrina por gentilmente ceder as células normais de rim de *Macaca mullata* (LLC-MK2), utilizados no presente estudo.

REFERÊNCIAS

COSTA, J. W. DA; FERREIRA, K. C. M. A.; MOUTINHO, N. F.; BEZERRA, T. DA S.; NUNES, V. M. DE A. A FITOTERAPIA NO CONTEXTO DA ATENÇÃO BÁSICA. **Revista Extensão & Sociedade**, v. 8, n. 2, p. 19-32, 5 jan. 2018.



- CRUZ, F. S.; ROSSATO, L. G. Cuidados com o Paciente Oncológico em Tratamento Quimioterápico: o Conhecimento dos Enfermeiros da Estratégia Saúde da Família. [S.I.]. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 61, n.4, p. 335-341, 2015.
- DUGASANI, S.; PICHKA, M. R.; NADARAJAH, V. D.; BALJEPALLI, M. K.; TANDRA, S.; KORLAKUNTA, J. N. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 515-520, 2010.
- ICB USP. Fundamentos de Metodologias Biomédicas: ensaio de MTT. 2019. 1 vídeo (3 min). Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=1-wK7Dd-v3s&t=1s>. Acesso em: 8 jun. 2021.
- Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2019.
- MAO, Q. Q.; XU, X. Y.; CAO, S. Y.; GAN, R. Y.; CORKE, H.; BETA, T.; LI, H. B. Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Foods** 2019, 8, 185. <https://doi.org/10.3390/foods8060185>
- 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.
- RADHAKRISHNAN, E. K.; BAVA, S. V.; NARAYANAN, S. S.; NATH, L. R.; THULASIDASAN, A. K.; SONIYA, E. V.; ANTO, R. J. [6]-Gingerol Induces Caspase-Dependent Apoptosis and Prevents PMA-Induced Proliferation in Colon Cancer Cells by Inhibiting MAPK/AP-1 Signaling. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. e104401, 2014.
- RODRIGUES, M. L.; LIRA, R. K. PERFIL FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DOS RIZOMAS DO GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2013.
- SHUKLA, Y.; SINGH, M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 45, n. 5, p. 683-690, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2006.11.002>.
- VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, n. July 2015, p. 237-245, 2011.
- YOUNG, H. Y.; LUO, Y. L.; CHENG, H. Y.; HSIEH, W. C.; LIAO, J. C.; PENG, W. H. Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 96, n. 1-2, p. 207-210, 2005.