Avaliação da atividade citotóxica de subfrações do látex de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

Kennon Rios Santos (PIBIC/CNPq//UEPG), Evelyn Assis de Andrade, Katia Sabrina Paludo (Orientador), e-mail: katiapaludo@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia estrutural, molecular e genética.

2.06.00.00-3 Morfologia, 2.06.01.00-0 Citologia e Biologia Celular.

Palavras-chave: cultivo celular, citotoxicidade, melanoma murinho, 3T3, B16F-10.

Resumo

O Brasil apresenta a maior diversidade genética do mundo, mas ainda pouco se sabe sobre o potencial terapêutico de suas espécies vegetais. Muitos dos fármacos atuais resultam de formas biologicamente ativas derivadas de organismos vivos. Nesse contexto se encontram as neoplasias, uma doença com alto índice de morbimortalidade e tratamento com muitos efeitos adversos. A espécie *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns pertence à família Euphorbiacea, muito utilizada na medicina popular e de grande ocorrência no Brasil. Objetivando investigar o potencial citotóxico *in vitro* do látex e frações (metanol, clorofórmio e hexano) de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns em linhagens celulares murinas de fibroblasto (3T3, normal) e melanoma (B16F-10, tumoral), foram realizados ensaios de citotoxicidade utilizando as técnicas do MTT e VN. Os CI_{50} encontrados para os tratamentos com o Látex foram (μg/mL; 3T3/B16F-10): MTT - 0,59; 0,52 e VN - 0,076; 0,019. A fração hexano foi considerada a mais promissora, apresentando CI_{50} de: MTT - 15,13; 8,59 e VN - 8,16; 7,44. O baixo CI_{50} encontrado justifica uma melhor investigação sobre as frações do látex de *E. umbellata* em seu potencial citotóxico.

Introdução

Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns é uma planta arbustiva, nativa da África tropical e introduzida posteriormente em países como Brasil e índia. É conhecida como janaúba, leitosinha, cancerola, milagrosa, avelós e cola-nota (MOTA et al., 2012; COSTA et al., 2012). O látex presente nesse vegetal é empregado etnofarmacologicamente para o tratamento de vários tipos de cânceres, na forma de uma garrafada na concentração aproximadamente 0,9 mg/mL (18 gotas do látex diluído em 1 litro de água) consumido 3x por dia. A planta também é utilizada para o tratamento de outras enfermidades como redução de verrugas e úlceras (LUZ et al., 2016; MUNHOZ et al., 2014).

Na composição do látex de *E. umbelatta* ocorre a presença de metabólitos secundários representados por taninos, cumarinas, antraquinonas, antocianinas e esteroides, porém os metabólitos com mais destaque são os terpenos (COSTA et al., 2012; ANDERSEN et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2013; NIELSEN et al., 1987; UZABAKILHO; LARGEAU; CASADEVAL, 1987). Os terpenos estão dentro dos produtos naturais que vem recebendo destaque nos últimos anos como potenciais agentes inibidores da proliferação celular, indutores de apoptose, supressores de angiogênese, além de retardar a metástase e melhorar a ação de outras substâncias quimioterápicas, exibindo boa atividade antineoplásica, tanto *in vitro* como *in vivo* (FERREIRA, 2014).

Considerando o uso medicinal da família Euphorbiaceae e consequente do gênero Euphorbia, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico do látex de *E. umbellata* e suas frações (metanol, clorofórmio e hexano) utilizando como modelo de estudo linhagens murinas de melanoma (B16F10) e fibroblasto (3T3)

.

Material e Métodos

Extração do látex e fracionamento: o látex foi coletado por meio de cortes transversais no caule de *Euphorbia umbellata*, na cidade de Ponta Grossa em outubro de 2015. Uma exsicata foi depositada e registrada no Herbário Maria Eneida P. Kauffmann Fidalgo, do Instituto de Botânica de São Paulo, sob número de registro SP453920. O fracionamento foi realizado por meio de um extrator de Soxhlet (capacidade de 250 mL) segundo CRUZ, L. S (2017) utilizando solventes de polaridade crescente.

Plaqueamento e tratamento das linhagens: as células foram adicionadas em placas de 96 poços (3000 células/poço) acrescidas de meio RPMI. Após 24 h o meio RPMI foi retirado e aos poços com as células foram acrescentadas concentrações decrescentes do látex (0,9; 0,75; 0,50; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 e 0,012 μg/mL) e das frações: metanol, clorofórmio e hexano, ambas nas concentrações decrescentes de 100 μg/mL, 50 μg/mL, 25 μg/mL, 12,5 μg/mL, 6,25 μg/mL, 3,125 μg/mL, 1,56 μg/mL, 0,78 μg/mL, 0,39 μg/mL e 0,195 μg/mL.

Ensaio de Citotoxicidade com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio, 5μg/mL): seguindo 48 h de incubação o tratamento foi retirado e as células foram incubadas com 100 μL de uma solução de 0,5 μg/mL de MTT. Depois de 2 h o excesso de MTT foi removido e foi acrescentado álcool isopropílico ácido para dissolver os cristais de formazan. A cor formada foi mensurada em 550 nm em leitor de microplacas. O controle foi realizado em poços contendo as células, mas sem a adição do látex. As absorbâncias (abs) obtidas em cada poço foram descontadas do poço considerado branco. A porcentagem de células viáveis foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: %viabilidade = (média da absorbância dos poços tratados – absorbância do branco) *100 / (média da absorbância dos poços controle – absorbância do branco), sendo considerado 100% a média da absorbância dos controles negativos.

Ensaio de Citotoxicidade com o Vermelho neutro (VN): após 48 h o tratamento foi retirado, os poços lavados com uma solução de PBS e as células foram acrescidas de uma solução de 200 μL de VN (40 μg/mL) por 2h, a 37ºC, para que o VN fosse internalizado pelas células. EM seguida os poços foram lavados com solução fixadora (formol 10% em 0,1M de $CaCl_2$) e o VN internalizado foi solubilizado com 200 μL de solução eluente (Ácido acético 10% + etanol 50%). A coloração obtida foi lida em 540nm. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada utilizando-se o mesmo procedimento que o MTT, originando gráficos de viabilidade celular.

Cálculo do CI_{50} e índice de seletividade (IS): por meio de uma curva de regressão linear, onde o eixo x representa as concentrações dos tratamentos e o eixo y o logaritmo da porcentagem de viabilidade celular encontrada, foi possível calcular a concentração de cada componente capaz de inviabilizar 50 % do crescimento celular (CI_{50}). Foi utilizado o programa GraphPad Prisma, versão 7.00. Após esse resultado foi calculado o IS (índice de seletividade), uma razão entre o CI_{50} de células normais (3T3) e as células tumorais (B16F-10), para poder determinar a seletividade do óleo por células tumorais.

ISSN 1676-0093

Análise estatística: os dados foram submetidos aos testes de distribuição normal de Shapiro-Wilk, e posteriormente analisados por ANOVA de uma via e pós teste de Tukey, com $p<0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prisma, versão 7.00 para Windows.

Resultados e Discussão

O látex de *E. umbellata* foi capaz de reduzir a viabilidade celular em todas as linhagens testadas, avaliando o resultado se utilizando das técnicas de MTT e VN. Na tabela 1 estão representados os resultados referentes ao cálculo do CI_{50} e IS do látex e garrafada de *E. umbellata*. O NCI (Instituto Nacional Americano do Câncer) recomenda como interessante para continuidade dos experimentos e purificação, extratos brutos com valores de CI_{50} inferiores a 30 μg/mL após 72 h de tratamento. Com esses valores foi calculado o IS, no correspondente estudo comparamos o IC_{50} da linhagem não tumoral (3T3) com o IC_{50} da linhagem de melanoma (B16-F10). Ayesh, Abed e Faris (2014) sugerem que para um composto ser considerado de baixa toxicidade e com boas chances de ser uma nova droga anticâncer deve apresentar um IS superior a 2.

Considerando que os resultados de citotoxicidade do látex foram significativos para o IC_{50} segundo o NCI e para o IS no tratamento do VN, segundo Ayesh, Abed e Faris (2014), foi realizado o fracionamento utilizando solventes de polaridades distintas, originando 3 frações: metanol, clorofórmio e hexano. Os resultados de CI_{50} e IS para cada fração estão representados na tabela 1.

Teste	3T3	B16F10	IS
Látex/Garrafada MTT	0,59 μg/mL	0,52 μg/mL	1,13
Látex/Garrafada VN	0,076 μg/mL	0,019 μg/mL	4
Fração Metanol MTT	> 100 μg/mL	> 100 μg/mL	1
Fração Metanol VN	> 100 μg/mL	> 100 μg/mL	1
Fração Clorofórmio MTT	> 100 μg/mL	> 100 μg/mL	1
Fração Clorofórmio VN	48,41 μg/mL	92,6 μg/mL	0,52
Fração Hexano MTT	15,13 μg/mL	8,59 μg/mL	1,76
Fração Hexano VN	8,16 μg/mL	7,44 μg/mL	1,10

Tabela 1. Valores correspondentes ao CI_{50} e IS para todas as frações, garrafada e composto integral do látex de *E. umbellata*, realizados em triplicata e repetidos em 4 momentos diferentes, a partir dos testes com MTT e VN para as linhagens murinas 3T3 (fibroblasto, normal) e B16F-10 (melanoma, tumoral).

Considerando os dados obtidos, o látex de *E. umbellata* apresentou concentrações reduzidas de CI_{50} para ambas as linhagens (3T3 e B16F-10) nos testes de MTT e VN e IS superior a 4 para o teste de VN, estes valores justificaram o fracionamento do látex. Dentre as frações obtidas, a que mais se destacou foi a fração hexano, apresentando valores de CI_{50} inferiores a 30 μg/mL como recomendado pelo NCI (Instituto Nacional Americano do Câncer), justificando a realização de mais estudos utilizando compostos derivados dessa fração a partir de um subfracionamento.

Conclusão

ISSN 1676-0093

O látex de *E. umbellata* foi citotóxico para as linhagens murinas de fibroblasto murino (3T3) e melanoma murino (B16F-10), das frações obtidas, a fração Hexano é a que se demonstrou mais promissora em relação as outras (Metanólica e Clorofórmica). Mais estudos devem ser realizados com as frações e subfrações de compostos de *E. umbellata* e espécies aparentadas, a fim de descobrir e desenvolver novos fármacos contra uma doença maligna como o câncer.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo fomento cedido, a UEPG por ceder toda a estrutura onde foram realizados a maioria dos experimentos e a equipe do Laboratório 55 de Cultivo Celular e Protozoologia por todo o apoio dado.

Referências

A, O. M. JORDHEIM, M. BYAMUKAMA, R. MBABAZI, A. OGWENG, G. SKAAR, L. KIREMIRE, B. **Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of Synadenium grantii (Euphorbiaceae)**. Phytochemistry, v. 71, p. 1558-1563. 2010.

AYESH, B.M.; ABED, A. A.; FARIS, D. M. In vitro inhibition of human leukemia HP-1 cells by Origanum syriacum L. and Thymus vulgaris L. extracts. **BMC Res Notes**, 7 (2014), p. 612.

COSTA, L. L. G. *et al*. Anti-ulcer activity of *Synadenium grantii* latex. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 5, p. 1070-1078. 2012.

DE OLIVEIRA, T. L. MUNHOZ, A. C. MINOZZO, B. R. NEPEL, A. BARISON, A. FÁVERO, G. M. CAMPAGNOLI, E. B. BELTRAME, F. L. Antitumoural effect of Synadenium grantii Hook f. (Euphorbiaceae) latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 263-269, 2013.

FERREIRA, M. D. L. **Terpenos: Potenciais agentes quimioterapêuticos obtidos de fontes naturais usados contra o câncer de pulmão**. Projeto de pesquisa (graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Paraná. João Pessoa. 2014.

LUZ, L. E. C. KANUNFRE, C. C. PALUDO, K.S.; DA SILVA, J. A. PETRY, V. K. LEMES, B. M. BARISON, A. NEPEL, A. WANG, M. AVULA, B. KHAN, I. A. BELTRAME, F. L. Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellate* (Pax) Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 29-37, 2016.

MUNHOZ, A. C. M. MINOZZO, B. R. CRUZ, L. OLIVEIRA, T. L. Chemical and Pharmacological Investigation of the Stem Bark of Synadenium grantii. **Planta Medica**, v. 80, n. 6, p. 458-464, 2014.

MOTA, M, F, DA. *et al*. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 319– 329. 2012.

NIELSEN, P. E. NISHIMURA, H. LIANG, Y. CALVIN, M. **Steroids from Euphorbia and other latex-bearing plants**. Phytochemistry, v. 18, p. 103-104. 1979.

UZABAKILIHO, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of Euphorbia candelabrum, Euphorbia grantii, Euphorbia tirucalli and Synadenium grantii. **Phytochemistry**, v. 26, n. 11, p. 3041-3045, 1987.