AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO HEXANO DO LÁTEX DE *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (EUPHORBIACEAE).

Evelyn Assis de Andrade (PROVIC), Flávio Luis Beltrame, Luiza Stolz Cruz (Co-orientadora), Priscileila Colerato Ferrari (Orientadora), e-mail: priscileila@hotmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Farmácia, Farmacognosia

Palavras-chave: Citotoxicidade, leucemia linfoide aguda, Jurkat.

Resumo

A maioria dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem relação estrutural com produtos de origem natural. A biodiversidade do Brasil justifica o enorme potencial para a descoberta de novos medicamentos, sendo a *Euphorbia umbellata* (janauba) usada empiricamente para tratamento de câncer. O objetivo deste estudo é avaliar o potencial citotóxico da fração hexano e subfrações do látex de *E. umbellata*, utilizando células de linhagem Jurkat. O fracionamento foi realizado em Soxhlet, utilizando hexano como solvente. A fim de obter as subfrações, submeteu-se nova extração, utilizando solventes de polaridade crescente. Os testes de citotoxicidade foram realizados com células de leucemia linfoide aguda de células T (Jurkat) e avaliados por redução do reagente azul de tetrazólio (MTT). A subfração diclorometano destaca-se com os menores valores de CI_{50} (0,200±0,957 µg/mL). O ensaio permitiu constatação do potencial citotóxico na fração hexano e subfrações, sendo a subfração diclorometano a que apresentou melhores resultados para a linhagem Jurkat.

Introdução

A leucemia linfoide aguda (LLA) é o tipo mais frequente de leucemia em crianças, caracterizado pelo acúmulo de células anormais na medula óssea (OLIVEIRA et. al, 2004). As estimativas da Sociedade Americana de Câncer (2017) para LLA nos Estados Unidos em 2017 são cerca de 5.970 novos casos e 1.440 mortes. O tratamento compreende, além de quimioterapia para remissão, a prevenção de doenças no sistema nervoso central com quimioterapia intratecal. Após remissão, o paciente realiza ciclos de manutenção por 2 a 3 anos (HAMERSCHLAK, 2008). A maioria dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem forte relação estrutural com os metabólitos de origem natural; de modo que a biodiversidade do Brasil justifica o estudo para a descoberta de novos medicamentos (COSTA-LOTUFO et.al., 2010).

Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns, é conhecida popularmente como janauba e usada etnofarmacologicamente para tratamento do câncer (seu látex diluído). A atividade citotóxica do látex e das frações de *E. umbellata* foi determinada por Luz et al. (2016) em diferentes linhagens celulares, sendo identificada a fração hexano como a mais citotóxica frente a células Jurkat. Desta forma este estudo propõe refracionamento da fração hexano, visando uma maior avaliação da atividade

citotóxica dos constituintes químicos presentes nestas subfrações desta espécie vegetal.

Materiais e Métodos

Obtenção das frações

O látex de *E. umbellata* foi coletado na cidade de Ponta Grossa – PR (24º 18' S e 49º 37' W) (975 metros de altitude, 25º 05´38´´S de latitude e 50º 09´30´´W de longitude), mediante incisões longitudinais no caule e armazenado sob refrigeração (±4 °C). O fracionamento foi realizado em extrator de Soxhlet, de forma exaustiva (5 horas, utilizando hexano como solvente extrativo. A fim de obter as subfrações da fração hexano, esta foi submetida a uma nova extração, utilizando solventes de polaridade crescente (éter de petróleo, diclorometano, etanol e metanol), empregando-se o mesmo procedimento. Após, concentrou-se em evaporador rotativo e armazenou-se sob refrigeração (±4 °C).

Avaliação da Citotoxicidade

Para realização dos testes de citotoxicidade, foram utilizadas células humanas de leucemia linfoide aguda de células T (Jurkat). As culturas foram mantidas por expansão contínua em meio RPMI® 1640 suplementado com soro fetal bovino (10%), em estufa a 37 °C e 5% de CO_2.
O efeito citotóxico foi avaliado por redução de azul de tetrazólio (MTT). As células Jurkat foram semeadas em fase logarítmica de crescimento, em placas de 24 poços, em concentração de $1x10^5$ células/mL ($0,5x10^5$ células/poço). Após 24 horas, aplicou-se tratamento em concentrações de 1,25 a 75 µg/mL. Decorridas 72 horas, as células foram homogeneizadas, transferidas para tubos de 2 mL e centrifugadas por 5 minutos a 1200 rotações por minuto (rpm).
O sobrenadante foi removido para que fosse adicionado 400 µL do MTT na concentração de 0,5 mg/mL sobre as células e, após ressuspensão, incubadas por 30 minutos. Após, centrifugou-se por 5 minutos a 3600 rpm, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 300 µL de DMSO P.A. para solubilização dos cristais de formazano. A solução foi transferida para placas de 96 poços para leitura de absorbância em espectrofotômetro a 550 nm.

Análise Estatística

Os resultados foram normalizados e analisados pelo programa estatístico *Graph Pad Prism* (versão 5). Executando-se análise de variância (ANOVA) de uma via, com pós-teste de Tukey, considerando $p<0,05$. Os resultados foram expressos em média + desvio padrão. Para determinação do CI_{50} utilizou-se o software StatPlus 4 (versão 5.9.8), análise de sobrevivência por regressão de Probit, método de Finney. Os resultados foram expressos em CI_{50} ± erro padrão da média.

Resultados e Discussão

O ensaio de MTT é amplamente utilizado para determinação de viabilidade celular. Células viáveis com metabolismo ativo – mitocondrial, especialmente - reduzem o

MTT a um cristal roxo (formazano) com absorção máxima próxima a 570 nm. Logo, para células em fase log de crescimento, a concentração de formazano desenvolvida é proporcional ao número de células viáveis (RISS et al., 2004).

A Figura 1 demonstra a responsividade das células Jurkat ao tratamento com a fração hexano do látex de *E. umbellata*. Analisando os resultados, observou-se decréscimo da viabilidade com aumento da concentração.

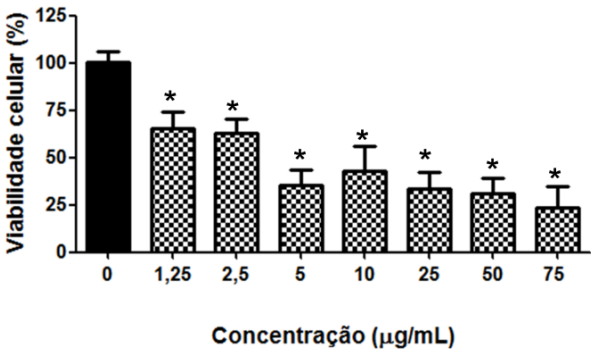


Figura 1 - Efeito da fração hexano do látex de *E. umbellata* na viabilidade celular da linhagem Jurkat. (Resultados analisados pelo teste ANOVA de uma via e pós teste de Dunnet, com nível de significância de 99%. Expressos em média e desvio padrão de 3 experimentos independentes e em quadruplicata. O símbolo * representa diferença estatística ($p<0,001$) em relação ao controle negativo (meio RPMI + DMSO 0,25%)).

O CI_{50} foi calculado para o tratamento com a fração hexano (4,624 ± 1,088 µg/mL), semelhante aos resultados obtidos em trabalhos prévios (LUZ *et al.*, 2016).

Da Mota, Valadares e Benfica (2012), estudando outras partes aéreas da espécie *E. umbellata* avaliaram o potencial citotóxico do extrato hidroalcoólico (95%) frente às linhagens Jurkat e K-562, concluindo que ambas foram sensíveis ao tratamento, entretanto as células Jurkat mostram-se mais resistentes.

Dado o potencial citotóxico promissor da fração hexano, as subfrações também foram avaliadas e a subfração diclorometano destacou-se como mais eficaz frente a linhagem Jurkat, seguida da subfração etanol, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de CI_{50} (µg/mL) determinados para o tratamento com as subfrações da fração hexano para a linhagem Jurkat.

Subfração	**CI_{50} ± erro padrão da média**
Éter	70,336±22,113
Diclorometano	0,200±0,957
Etanol	8,314±7,934
Metanol	2,581±185,053

O resultado promissor da subfração diclorometano pode estar associado à sua composição química, uma vez que além de possuir os triterpenos comuns ao gênero *Euphorbia,* possui diterpenos do tipo forbol, descrito na literatura como substância citotóxica (VASAS e HOHMANN, 2014).

Conclusões

A realização do ensaio de citotoxicidade permitiu a constatação do potencial citotóxico na fração hexano do látex de *Euphorbia umbellata,* assim como o potencial da subfração diclorometano, a qual apresentou melhores resultados no ensaio de citotoxicidade para a linhagem celular Jurkat.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, por viabilizar o desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What Are the Key Statistics About Acute Lymphocytic Leukemia?** Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-tatistics.html>. Acesso em: 9 de marco de 2017.

LUZ, L. E. *et al.* Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 29-37, 2016.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 47-58, 2010.

DA MOTA, M. F.; BENFICA, P. L.; VALADARES, M. C. *Synadenium umbellatum* Pax. promotes cell cycle arrest and induces apoptosis in K-562 leukemia cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 497-505, 2012.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal De Pediatria,** v. 84, n. 4, p. S52-S57, 2008.

OLIVEIRA, B. M. *et. al*. Leucemias agudas na infância. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, suppl. 1, p. 33-39, 2004.

RISS, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S.; GAL-EDD, N.*, et al* (Ed.). **Assay Guidance Manual.** Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

VASAS, A.; HOHMANN, J. *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008-2012). **Chemical Reviews**, v. 114, n. 17, p. 8579-8612, 2014.