



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

ADRIEZE DA COSTA SILVEIRA

Avaliação *in vitro* do potencial antitumoral de extratos e substâncias isoladas de uma planta da Caatinga X

SALVADOR – BA

2018

ADRIEZE DA COSTA SILVEIRA

Avaliação *in vitro* do potencial antitumoral de extratos e substâncias isoladas de uma planta da Caatinga X

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Amancio José de Souza.

SALVADOR – BA

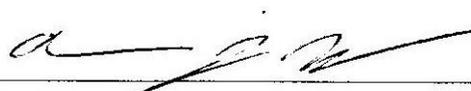
2018

ADRIEZE DA COSTA SILVEIRA

Avaliação *in vitro* do potencial antitumoral de extratos e substâncias isoladas de uma planta da Caatinga X

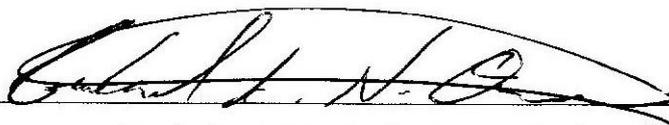
Esta monografia foi julgada adequada à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 10 de novembro de 2018.



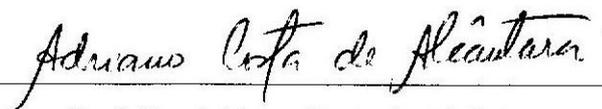
Prof. Dr. Amancio José de Souza

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Gabriel Andrade Nonato Queiroz

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Dr. Adriano Costa de Alcântara

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

RESUMO

O câncer é uma doença que tem como característica principal o crescimento desordenado de células que podem invadir órgãos e tecidos produzindo tumores que induzem transtornos funcionais e metabólicos, podendo levar o indivíduo ao óbito rapidamente. A quimioterapia antitumoral é uma das principais formas de tratamento do câncer, porém apresenta limitações como frequentes casos refratários e efeitos tóxicos sistêmicos aos pacientes. O desenvolvimento de drogas mais eficientes contra o câncer é fundamental e a bioprospecção é uma abordagem extremamente importante para esta finalidade. A planta X encontrada na Caatinga, dentre outros biomas, pertence à família das Leguminosas, e utilizada para fins terapêuticos devido à presença de alcaloides indólicos, taninos e outros compostos usados como fitoterápicos. A diversidade de compostos úteis presentes na planta, principalmente a fração antioxidante, sugere um potencial para a descoberta de substâncias com atividade antitumoral. Sob esta perspectiva, utilizou-se uma linhagem celular de melanoma murino (B16-F10) com o intuito de avaliar extratos e substâncias isolados da espécie X quanto à atividade antitumoral. Células cultivadas *in vitro* foram incubadas com extratos, fração alcaloide e substância obtidos da planta para avaliar impacto na proliferação celular. Resultados preliminares demonstram que extratos U8, U9 e U17 obtidos da planta exibem baixa atividade supressora do crescimento das células B16-F10 *in vitro*.

Palavras-chave: Atividade antitumoral, Bioprospecção, Câncer, Melanoma murino, B16-F10, Planta X.

ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by the disordered growth of cells that can invade the organs and tissues, which can lead to death quickly. Antitumor chemotherapy is one of the main forms of cancer treatment, but it has limitations such as frequent refractory cases and systemic toxic effects to patients. The development of more effective drugs against cancer is essential and bioprospeccion is an extremely important approach for this purpose. Plant X found in the Caatinga, among other biomes, belonging to the family of Leguminosae, and used for therapeutic purposes derived from the presence of indole alkaloids, tannins and other compounds used as phytotherapics. The diversity of useful compounds present on the plant, mainly the antioxidant, fraction suggests a potential for the discovery of substances with anti-tumor activity. From this perspective, a murine melanoma cell line (B16-F10) was used in an attempt to evaluate extracts and substances isolated from the plant X for antitumor activity. Cells cultured *in vitro* were incubated with extracts, alkaloid fraction and a substance obtained from the plant to evaluate impact on cell proliferation. Preliminary results demonstrate that extracts U8, U9 e U17 obtained from the plant exhibit low growth suppressive activity of B16-F10 cells *in vitro*.

Keywords: Antitumor activity; Bioprospeccion; Cancer; Murine melanoma, B16-F10, Plant X.

SUMÁRIO

1. ARTIGO CIENTÍFICO	7
• INTRODUÇÃO	9
• MATERIAL E MÉTODOS	11
• RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
• CONCLUSÃO	24
• AGRADECIMENTOS	24
• REFERÊNCIAS	26
2. PROPOSTA DE SUBMISSÃO.....	28
2.1 REVISTA: REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS.....	28
2.2 REGRAS PARA SUBMISSÃO:.....	28

1. Artigo científico

Avaliação *in vitro* do potencial antitumoral de extratos e substâncias isoladas de uma planta da Caatinga X

SILVEIRA, A.C¹; SILVA, J.J¹; NETA, L.C.S²; LEAL, T.A.T²; SOUZA, A.J^{1*}

¹ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Núcleo de Pesquisa e Inovação da Bahiana, Avenida Dom João VI, nº 275, Brotas, Salvador, Bahia, CEP: 40290-000. ² Universidade do Estado da Bahia. * Autor para correspondência: amanciosouza@bahiana.edu.br.

RESUMO: O câncer é uma doença que tem como característica principal o crescimento desordenado de células que podem invadir órgãos e tecidos produzindo tumores que induzem transtornos funcionais e metabólicos, podendo levar o indivíduo ao óbito rapidamente. A quimioterapia antitumoral é uma das principais formas de tratamento do câncer, porém apresenta limitações como frequentes casos refratários e efeitos tóxicos sistêmicos aos pacientes. O desenvolvimento de drogas mais eficientes contra o câncer é fundamental e a bioprospecção é uma abordagem extremamente importante para esta finalidade. A planta X encontrada na Caatinga, dentre outros biomas, pertence à família das Leguminosas, e utilizada para fins terapêuticos devido à presença de alcaloides indólicos, taninos e outros compostos usados como fitoterápicos. A diversidade de compostos úteis presentes na planta, principalmente a fração antioxidante, sugere um potencial para a descoberta de substâncias com atividade antitumoral. Sob esta perspectiva, utilizou-se uma linhagem celular de melanoma murino (B16-F10) com o intuito de avaliar extratos e substâncias isolados da espécie X quanto à atividade antitumoral. Células cultivadas *in vitro* foram incubadas com extratos, fração alcaloide e uma substância obtidos da planta para avaliar im-

pacto na proliferação celular. Resultados preliminares demonstram que extratos U8, U9 e U17 obtidos da planta exibem baixa atividade supressora do crescimento das células B16-F10 *in vitro*.

Palavras-chave: Atividade antitumoral, Bioprospecção, Câncer, Melanoma murino, B16-F10, Planta X.

ABSTRACT: *In vitro* activity of the antitumor potential of extracts and substance isolated from plant X. Cancer is a disease characterized by the disordered growth of cells that can invade the organs and tissues, which can lead to death quickly. Antitumor chemotherapy is one of the main forms of cancer treatment, but it has limitations such as frequent refractory cases and systemic toxic effects to patients. The development of more effective drugs against cancer is essential and bioprospeccion is an extremely important approach for this purpose. Plant X found in the Caatinga, among other biomes, belonging to the family of Leguminosae, and used for therapeutic purposes derived from the presence of indole alkaloids, tannins and other compounds used as phytotherapics. The diversity of useful compounds present on the plant, mainly the antioxidant, fraction suggests a potential for the discovery of substances with antitumor activity. From this perspective, a murine melanoma cell line (B16-F10) was used in an attempt to evaluate extracts and substances isolated from the plant X for antitumor activity. Cells cultured *in vitro* were incubated with extracts, alkaloid fraction and a substance obtained from the plant to evaluate impact on cell proliferation. Preliminary results demonstrate that extracts U8, U9 e U17 obtained from the plant exhibit low growth suppressive activity of B16-F10 cells *in vitro*.

Keywords: Antitumor activity; Bioprospecting; Cancer; Murine melanoma, B16-F10, Plant X.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que tem como característica principal o crescimento desordenado de células que podem invadir órgãos e tecidos acarretando em transtornos funcionais e metabólicos, podendo levar o indivíduo ao óbito rapidamente. Com alta taxa de divisão, as células apresentam padrões de desenvolvimento desordenado, o que pode provocar o aparecimento de tumores malignos (INCA, 2013).

O câncer ou neoplasia maligna pode ser resultado do acúmulo de diferentes alterações genéticas e epigenéticas. A etiologia do câncer pode estar relacionada à exposição a substâncias químicas, vírus, radiação, fumo, álcool, dieta, e/ou outros motivos que resultam em células com sinais de crescimento próprios e que apresentam ausência de sensibilidade a fatores inibitórios de crescimento, evasão dos mecanismos de apoptose, defeitos no reparo de DNA, ausência de limite na capacidade replicativa, formação de novos vasos e habilidade de invadir e realizar metástase (Hannahan & Weinberg, 2011).

O câncer é um problema de saúde pública (INCA, 2013), e apesar dos avanços no tratamento dessa doença, os casos de morbimortalidade tem aumentado no mundo (Siegel et al., 2016). A terapia antitumoral ainda apresenta grandes limitações, como frequentes casos refratários e efeitos tóxicos sistêmicos aos pacientes. Moléculas extraídas de plantas têm demonstrado importante potencial para tratar vários tipos de câncer, a exemplo do medicamento paclitaxel (Taxol®) isolado da *Taxus brevifolia* (Brandão et al., 2010), e a Vimblastina isolada da *Cathartus roseus*, utilizadas na terapia em sua forma natural (Souza, 2004).

Grupos de pesquisa têm adotado a bioprospecção de fármacos naturais ou semissintéticos, na tentativa de descobrir novos medicamentos que sejam eficazes, mais específicos e melhor tolerados pelos pacientes. Em meio a esta busca, a família de plantas Fabaceae, que possui três subfamílias (Papilionoidae, Mimosidae e Caesalpiniodae) compreende uma diversidade de metabólitos secundários como, por exemplo, flavonóides, que são substâncias naturais com atividades anticâncer, antioxidantes, antiestrogênicas e antimicrobianas (Oliveira, 1999).

Dentro da subfamília Mimosidae, o gênero *Mimosa* contém algumas espécies com potencial antitumoral devido à quantidade e diversidade de flavonóides que apresentam. A *Mimosa pudica* L., por exemplo, possui flavonóides com propriedades anticancerígenas, antibacterianas, anti-infertilidade, anticonvulsionantes, antidepressivas e várias outras atividades farmacológicas (Grupta et al, 2012).

A planta X é encontrada principalmente no nordeste do Brasil, na Caatinga, e é conhecida popularmente na região como 'Jurema Preta'. Esta planta é utilizada para tratamentos de doenças respiratórias, febre e úlceras. Além disso, a planta é utilizada nos cultos religiosos de grupos indígenas e afrodescendentes por ter alto poder alucinógeno (Souza et al., 2008). Estudos fitoquímicos da planta determinaram a identificação e separação de alcaloides indólicos, taninos e outros compostos importantes com potencial terapêutico (Riviera Arce et al., 2007; Souza et al., 2008).

Assim como indicam muitos estudos acerca de espécies da mesma família ou no gênero da planta, esta pode oferecer a possibilidade de revelar substâncias de interesse terapêutico. Além disso, tratando-se de uma espécie encontrada na Caatinga, as pesquisas relativas a esta podem servir como ponto de partida para a exploração de recursos naturais locais, desenvolvendo esta região historicamente de-

sassistida e estimulando a preservação e estudo deste bioma de rico potencial farmacológico.

Este trabalho teve por objetivo geral avaliar extratos, fração alcaloide e uma substância obtidos da espécie X quanto à atividade antitumoral utilizando a linhagem celular tumoral de melanoma murino (B16-F10).

MATERIAL E MÉTODOS

Origem do material vegetal

Folhas, frutos e caules de um espécimen da planta X, foram coletados por Leal (2018) em uma área de Caatinga, localizada no campus de Juazeiro da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) em 13 de março de 2013. A exsicata da planta foi depositada no Herbário Central da UNEB (nº 22967). Os extratos e a substância foram obtidos em junho de 2018.

Obtenção dos extratos e substância

Toda a etapa de origem do material vegetal e obtenção de extratos e substâncias da planta foram desenvolvidas pela equipa da Dra. Lourdes Cardoso de Souza Neta, responsável pelo Laboratório de Química da UNEB.

A obtenção dos extratos metanólicos de partes de *M. tenuiflora*: caule (Extrato U10), casca do caule (Extrato U8), folhas (Extrato U17) e do fruto (Extrato U9) foi por maceração a frio, com metanol, conforme metodologia descrita por Leal (2018).

O extrato em metanol do caule foi submetido à extração ácido-base para obtenção de uma fração constituída por uma mistura de alcaloides: N, N-dimetiltriptamina e hordenina (U1) (Leal, 2018). Além disso, o extrato em metanol do caule foi fracionado por sucessivas técnicas cromatográficas clássicas para a obten-

ção de um derivado de flavanona (U4) (Leal, 2018). Nesse estudo, os extratos e substância foram identificados por códigos escolhidos aleatoriamente.

Cultivo celular da linhagem B16-F10

A linhagem celular B16-F10 (melanoma murino) foi obtida do Instituto Gonçalo Moniz (Brasil) e mantida e cultivada em frascos para cultura celular estéreis de 75 cm² e volume de 200mL (Greiner bio-one, Kremsmünster, Áustria), e incubada em estufa de CO₂ (Tecnal, TE-399, SP/Brasil) com atmosfera suplementada de 5%, mantida a temperatura de 37°C. A manutenção das células foi feita a cada 48 ou 72 horas de crescimento celular, e se necessário foi feito o repique da célula para outros frascos estéreis. O meio de cultivo utilizado foi o RPMI® 1640 (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, Lote: 1179818) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal inativado (SBF) sem acréscimo de antibiótico (Sigmaaldrich, St. Louis, Missouri, USA, Lote: 2101180K).

Atividade antitumoral *in vitro*

Para o teste da citotoxicidade *in vitro*, foram adicionados inóculos de 1×10^5 células tumorais/poço (em fase de crescimento logarítmico) em placas de cultura de 96 poços (Kasvi, PR/Brasil) e incubado por 24h a 37°C com atmosfera suplementada de 5% de CO₂. Após o período de incubação, as substâncias e extratos foram adicionados em concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100µg/mL, em um volume final de 200µl e incubadas por 24h. A viabilidade celular foi medida pelo método de alamarBlue® da BIO-RAD (Najaran et al, 2016). Pela condição da linhagem B16-F10 ser aderente à placa, foi possível verter a placa para descartar todo o volume nos poços e, a partir disso, foi adicionado 100µl do reagente diluído a 10% e reservado na estufa por 4h. Após o fim das 4h, a leitura da placa foi feita utilizando um espec-

trofotômetro, nos dois comprimentos de onda de 570nm e 600nm. O alamarBlue® - funciona como indicador de viabilidade das células medindo quantitativamente a proliferação celular - A resazurina, que é a substância ativa do reagente, é um composto permeável às células, e que, permanecendo em sua forma oxidada, possui a coloração azul, representando à ausência da viabilidade celular. Quando o reagente entra em contato com as células vivas, este composto é reduzido a resorufina, mudando de coloração de azul para rosa, representando a viabilidade/proliferação da célula. A Doxorrubicina foi escolhida como controle positivo por ser um fármaco utilizado na quimioterapia do câncer. Para o controle de Doxorrubicina, utilizamos diferentes concentrações de 0,0192; 0,096; 0,48; 2,4; 12 e 60µg/mL sobre a célula da linhagem B16-F10. Como controle negativo, utilizamos 6 poços por placa contendo inóculos das células B16-F10 e apenas meio RPMI suplementado com 10% de SBF inativado.

Para calcular a porcentagem de proliferação foi utilizada a fórmula fornecida pelo Kit da BIO-RAD (catálogo nº 7/ alamarBlue® Technical Datasheet) do reagente alamarBlue® (% de células viáveis = $[(O2 \times A1) - (O1 \times A2) / (O2 \times P1) - (O1 \times P2)] \times 100$, onde O1 = coeficiente de extinção molar (E) do alamarBlue® oxidado (azul) a 570 nm (80586), O2 = E de alamarBlue® oxidado a 600 nm (117216), A1 = absorvância dos poços de teste a 570 nm, A2 = absorvância dos poços de teste a 600 nm, P1 = absorvância do controle negativo (células mais alamarBlue®, sem nenhum agente de teste) a 570 nm e P2 = absorvância do controle negativo (células mais alamarBlue®, sem nenhum agente de teste a 600 nm).

Foram feitos, pelo menos, 3 ensaios independentes, cada um realizado em triplicata.

Desenvolvimento e análise estatística

Todos os experimentos foram desenvolvidos no Núcleo de Pesquisa e Inovação da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e na Fundação Oswaldo Cruz Bahia (Instituto Gonçalo Moniz). Os dados apresentados indicam a média \pm desvio padrão, de pelo menos, 3 experimentos independentes. A partir das curvas de concentração x resposta foi possível calcular a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em células tumorais B16F10. A comparação entre diferentes concentrações de um mesmo tratamento foi feita usando ANOVA seguido de Teste de Tukey considerando diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. A análise estatística foi feita utilizando o Graphpad Software versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Doxorubicina é uma conhecida substância antitumoral pertencente à classe das antraciclinas, amplamente utilizada na quimioterapia, apresentando amplo espectro de atividade contra os tumores malignos (Swift et al, 2006), por esse motivo, o fármaco foi escolhido como controle positivo para avaliar a citotoxicidade sobre linhagem de melanoma murino (B16-F10). A Doxorubicina, neste estudo, apresentou uma redução estatisticamente significativa da porcentagem de células viáveis à medida que aumentamos as concentrações da droga ($p < 0,05$), além de boa linearidade, obtida por regressão linear, indicando sua atividade antitumoral (Figura 1). No programa de triagem do Instituto nacional de Câncer (INCA), considera-se potente atividade antitumoral, as drogas que apresentam $IC_{50} \leq 4,0 \mu\text{g/mL}$ (Bogo, 2012). Comparando esse parâmetro com nosso estudo, o IC₅₀ da Doxorubicina foi de $1,98 \mu\text{g/mL}$ frente à célula tumoral de melanoma murino (B16-F10), mesmo levando em conside-

ração, que na máxima concentração (100 µg/mL), a droga não inibiu 100% das células.

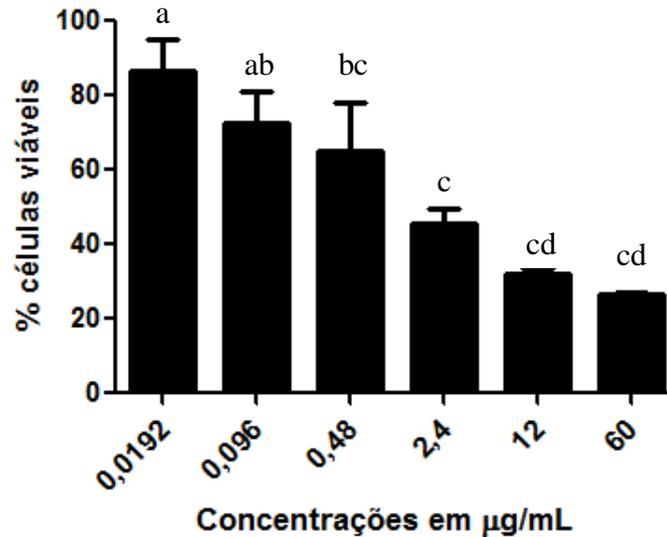


FIGURA 1. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com o controle positivo (Doxorrubicina) em diferentes concentrações. Dados representativos de 3 experimento independentes. Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) obtendo-se o valor de p menor que 0,05 (valor de $p=0,000002$). Análise de regressão linear indica correlação adequada $R^2=0,9809$, mostrando atividade antitumoral frente à célula B16-F10. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, as médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p<0,05$). As porcentagens de células viáveis foram de 86%, 72%, 65%, 46%, 32% e 27%, respectivamente às concentrações testadas (0,0192, 0,096, 0,48, 2,4, 12 e 60 µg/mL).

Neste trabalho avaliamos o potencial antitumoral de 4 extratos metanólicos: 1 da folha (U17), 1 do caule (U10), 1 da casca do caule (U8) e 1 do fruto (U9), além de ser testada uma fração alcaloide (mistura de N, N-dimetiltriptamina com hordenina-U1) e uma substância flavanona (U4) que foram obtidos do estudo fitoquímico da planta X. (Leal, 2018). Para avaliação do efeito antitumoral das amostras da espécie, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para determinar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos ($p<0,05$) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey ($p<0,05$), utilizando o programa estatístico Graphpad Prism 5.0. Além disso, foi calculado o coeficiente de correlação linear

(R^2) para observar a relação de linearidade entre os tratamentos com o efeito de inibição celular e a concentração inibitória de 50% (IC_{50}) para avaliar efeitos citotóxicos.

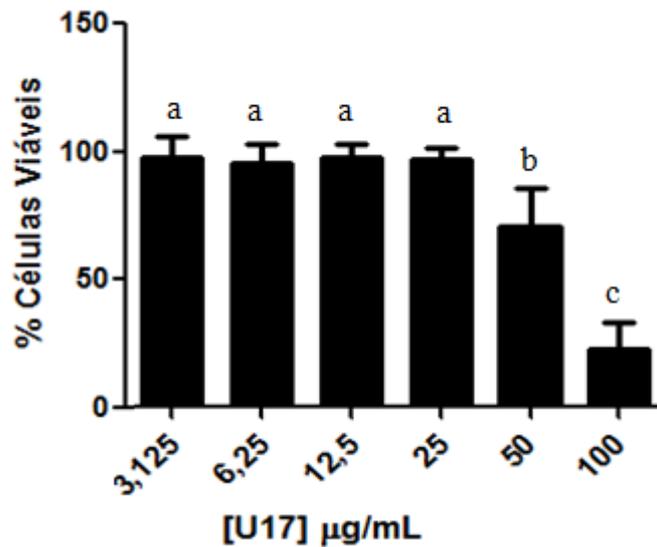


FIGURA 2. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com o extrato metanólico da folha (U17) da planta em diferentes concentrações. Dados representativos de 3 experimento independentes. Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) obtendo-se o valor de p menor que 0,05 (valor de $p = 0,00000187$). Análise de regressão linear indica correlação adequada $R^2 = 0,9714$ a partir de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, as médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). As porcentagens de células viáveis foram de 98%, 96%, 97%, 97%, 71% e 23%, respectivamente às concentrações testadas (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$).

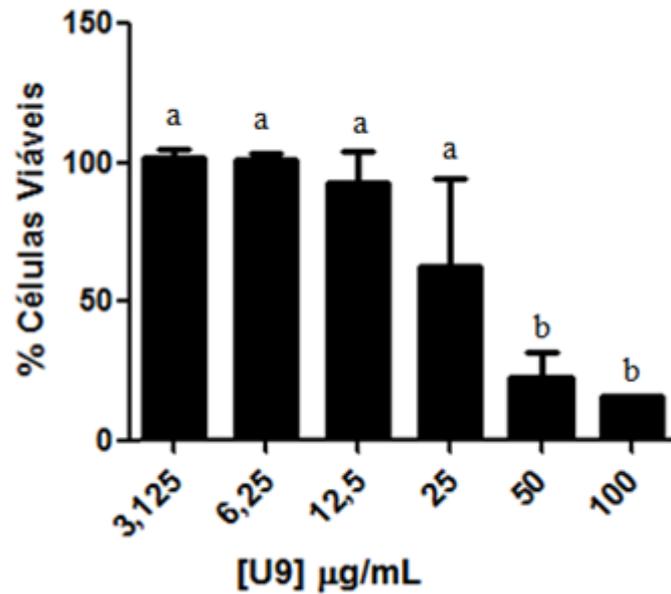


FIGURA 3. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com o extrato metanólico da folha (U9), da planta em diferentes concentrações. Dados representativos de 3 experimento independentes. Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) obtendo-se o valor de p menor que 0,05 (valor de $p=0,0001201$). Análise de regressão linear indica correlação adequada $R^2 =$ de 0,9372 a partir de 12,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, as médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p<0,05$). As porcentagens de células viáveis foram de 100%, 100%, 92%, 62% 22% e 16%, respectivamente às concentrações testadas (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$).

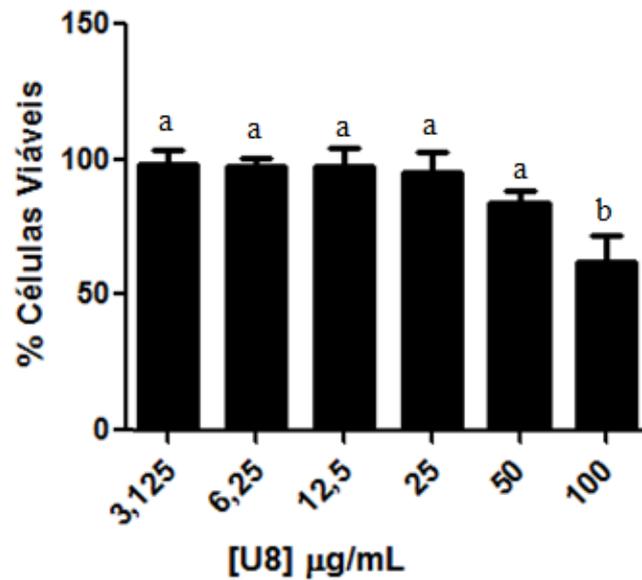


FIGURA 4. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com o extrato metanólico da casca do caule (U8) da planta em diferentes concentrações. Dados representativos de 3 experimento independentes. Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) obtendo-se o valor de p menor que 0,05 (valor de $p=0,000107$). Análise de regressão linear indica correlação adequada $R^2=0,9643$ a partir de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, as médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p<0,05$). As porcentagens de células viáveis foram de 98%, 98%, 97%, 95%, 84% e 62%, respectivamente às concentrações testadas (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$).

Os resultados obtidos nos extratos U17 (Figura 2), U9 (Figura 3) e U8 (Figura 4) apresentaram significância estatística pelo Teste de Tukey. Nos três extratos testados, o tratamento com a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ levou a uma redução significativa da proliferação das células tumorais quando comparado com as demais concentrações. A inibição da linhagem em concentrações elevadas (100 $\mu\text{g/mL}$) possivelmente inviabilizará a utilização deste material no tratamento do câncer em humanos, pois geralmente as drogas anticarcinogênicas, em altas doses, não poupam as células saudáveis de sua ação destrutiva podendo ocorrer diversos efeitos tóxicos sistêmicos aos pacientes (Behling et al, 2004). Esses resultados, no entanto, sugerem a possibilidade de aprofundar as investigações sobre a estrutura das moléculas presentes com o intuito de aumentar a seletividade e diminuir a toxicidade (Chung et. al, 1999). Segundo o INCA, os extratos brutos que apresentassem $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$,

poderiam ter grande atividade citotóxica (Bogo, 2012). Diante disso, os valores determinados de IC_{50} dos extratos U17 (Figura 2), U9 (Figura 3) e U8 (Figura 4) foram de 67,31 $\mu\text{g/mL}$, 31,43 $\mu\text{g/mL}$ e 134,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Levando em consideração esses resultados com os apresentados na literatura, estes não apresentariam efeito antiproliferativo, porém se a curva de concentração x resposta fosse ampliada a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$, poderíamos encontrar o IC_{50} com mais confiança.

O gênero *Mimosa* compreende 38 espécies encontrados na Caatinga (Oliveira, 2011), algumas destas com o potencial de possuir atividade antitumoral. A espécie *Mimosa pudica L.*, por exemplo, tem se destacado em apresentar metabólitos secundários como flavonóides capazes de ajudar na terapia do câncer. Estudos mostram que os flavonóides são passíveis de influenciar na morte da célula tumoral devido seu papel de antioxidante, além de atuar na inibição de oncogenes e na ativação da resposta imune contra as células tumorais (Joseph et al, 2013).

Um estudo desenvolvido por Oliveira (2011) relatou que a planta X demonstra potencial antimicrobiano, antitérmico, antifúngico e antitumoral devido à presença de metabólitos responsáveis por tais atividades e que podem ser encontrados em abundância nas folhas, cascas do caule, frutos, raízes e ramos da planta (Oliveira, 2011). Os resultados encontrados em nossos experimentos corroboram a literatura, pois estudos fitoquímicos de extratos provenientes da casca do caule, folha e frutos apresentaram maiores quantidades de flavonóides, taninos e alcaloides, o que pode explicar o potencial efeito antitumoral sob a linhagem testada. (Bezerra, 2008). Dessa forma, os extratos testados no nosso trabalho que apresentaram citotoxicidade significativa sobre a linhagem de melanoma murino (U17, U9 e U8) podem conter substâncias responsáveis por tais atividades, e, uma vez que os extratos compreendem diversas moléculas, estes devem ser melhor avaliados. Além

disso, a possível ação citotóxica indicada pelo nosso estudo precisa ser validada em células não tumorais para verificar o índice de seletividade.

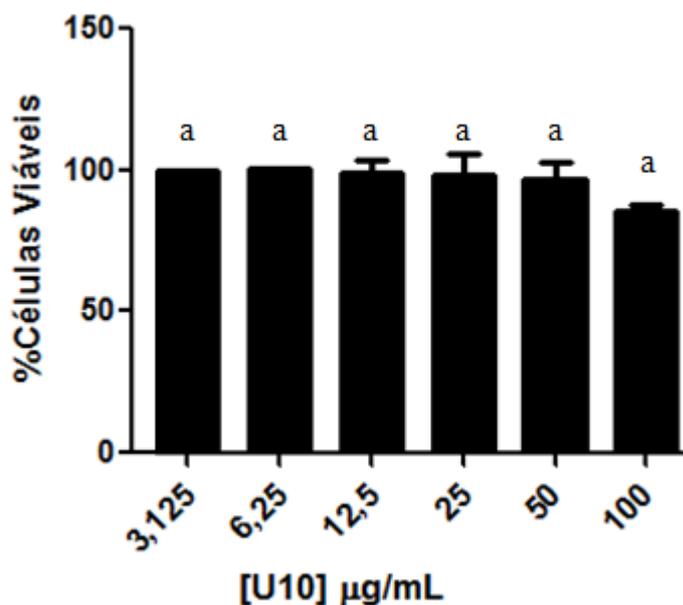


FIGURA 5. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com o extrato metanólico do caule (U10) da planta em diferentes concentrações. Dados representativos de 3 experimento independentes. Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) obtendo-se o valor de p maior que 0,05 (valor de $p=0,08641$). Análise de regressão linear indica correlação inadequada $R^2=0,7545$. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, as médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p<0,05$). As porcentagens de células viáveis foram de 100%, 100%, 99%, 99%, 97% e 86%, respectivamente às concentrações testadas (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL).

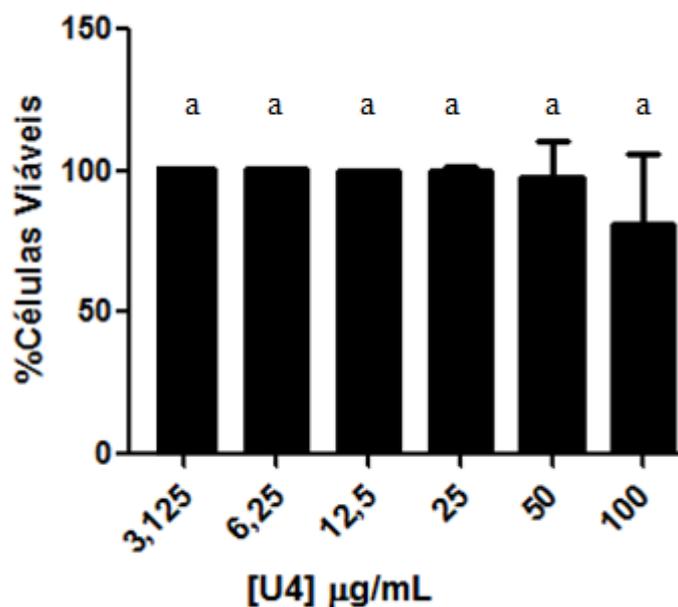


FIGURA 6. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com flavanona (U4), isolada do extrato metanólico do caule da planta em diferentes concentrações. Dados representativos de 3 experimento independentes. Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) obtendo-se o valor de p maior que 0,05 (valor de $p=0,0678$). Análise de regressão linear indica correlação inadequada $R^2 = 0,7129$. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, as médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). As porcentagens de células viáveis foram de 100%, 100%, 100%, 100%, 97% e 81%, respectivamente às concentrações testadas (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL).

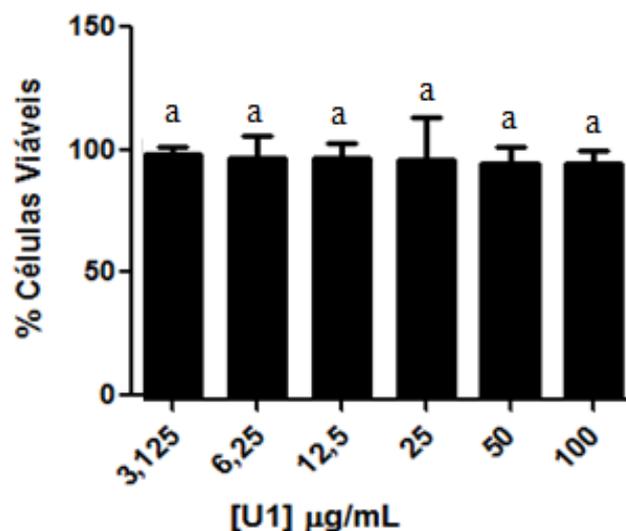


FIGURA 7. Viabilidade celular da linhagem B16-F10 tratada com a fração alcaloide [N, N-dimetiltriptamina e hordenina (U1)], em diferentes concentrações. Dados representativos de 3 experimento independentes. Cada barra representa a média \pm desvio padrão. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) obtendo-se o valor de p maior que 0,05 (valor de $p=0,995$). Análise de regressão linear indica correlação inadequada $R^2=0,8$. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, as médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p<0,05$). As porcentagens de células viáveis foram de 100%, 98%, 98%,98%, 96% e 96%, respectivamente às concentrações testadas (3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL).

O extrato U10 (Figura 5), a flavanona (U4) (Figura 6) e a fração alcaloide (U1) (Figura 7) não apresentaram atividade antitumoral, pois não demonstraram efeito inibitório em células B16-F10 com as concentrações testadas. Observa-se que a taxa de células viáveis dos compostos e substância se mantiveram constantes e, apesar de alguns destes terem diminuído na maior concentração (100 µg/mL), os resultados obtidos da análise de variância e pelo valor de p , maiores que 0,05, mostraram que não tiveram diferença estatística entre as concentrações testadas.

Não foram encontrados relatos na literatura que descrevam detalhadamente as substâncias que são encontradas no caule da planta X e que possam ter efeito antitumoral. Apesar dos inúmeros estudos encontrados relacionando flavonóides, taninos e alcaloides e o gênero *Mimosa* com atividade anticancerígena, não existe

um padrão claro dos experimentos, o que dificulta a comparação mais precisa com os nossos resultados. Sabe-se na literatura que a substância Flavanona (U4) pertence a uma classe de flavonóides e que esta possui atividades antifúngicas e antimicrobianas (Arif et al., 2011; Bylka et al., 2004), mas ainda não existem achados sobre o possível potencial antitumoral.

Estudos mostram que na flora, em geral, existem muitas plantas com substâncias ou compostos com propriedades alucinógenas, uma dessas é a planta X encontrada na Caatinga e usada em rituais religiosos por grupos indígenas e conhecida por ter alto poder alucinógeno. Uma das substâncias existentes no caule da planta, a qual foi testada neste estudo, é a N, N-Dimetiltriptamina (DMT) (Souza et al, 2008). Ainda não existem estudos profundos sobre o mecanismo de ação da substância como potencial antitumoral e mesmo que esses dados sejam bastante explorados na literatura, no nosso estudo, testou-se a mistura do DMT com outro alcaloide chamado Hordenina que juntos não apresentaram efeitos significativos quanto à redução da linhagem de melanoma murino (B16-F10). Para avaliação antitumoral dos dois alcaloides seria mais interessante o seu estudo como compostos puros e separados, impedindo as interações químicas, possivelmente interferindo nas suas propriedades farmacológicas.

A procura por novas rotas terapêuticas é de extrema importância para tentar solucionar os problemas existentes na terapia contra o câncer, tais como baixa especificidade, alta toxicidade, resistência medicamentosa, dentre outros. O Brasil contém vasta biodiversidade com a mais rica fonte de compostos e substâncias farmacologicamente ativos contra vários tipos de câncer (Lotufo, 2010). As fontes naturais podem oferecer melhores possibilidades de encontrar compostos de interesse terapêutico devido à complexidade das moléculas presentes no material vegetal que são

de difícil síntese *in vitro*. Isso mostra a importância do investimento em pesquisas nessa área.

Apesar de apresentar tantos compostos naturais e essenciais para uso terapêutico, ainda não se tem muitos relatos detalhados na literatura sobre a planta apresentando potencial antitumoral. Por isso com os resultados apresentados nesse estudo, espera-se contribuir para enfatizar suas ricas propriedades farmacológicas.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os extratos metanólicos oriundos da folha (U17), fruto (U9) e da casca do caule (U8) da planta X suprimiram a proliferação da linhagem celular aqui testada. No entanto, estudos futuros devem ser realizados a fim de se obter mais informações sobre o princípio ativo responsável pelo efeito e o mecanismo de ação pelo qual este exerce sua atividade. Apesar destes resultados, faz-se ainda necessário a avaliação citotóxica em células não tumorais para verificar a seletividade da substância e extratos testados.

AGRADECIMENTOS

À professora Alene Vanessa que participou no desenvolvimento conceitual do projeto. Ao Dr. Amancio José de Souza juntamente com a MSc. Jacqueline de Jesus Silva que supervisionaram o trabalho de laboratório e contribuíram para a leitura crítica do manuscrito. À Dra. Lourdes Cardoso junto com sua equipe do laboratório de química da Universidade do Estado da Bahia que contribuíram com valiosos co-

mentários e o fornecimento dos extratos e substâncias testadas. Aos colegas do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) que cederam à linhagem celular B16-F10 para o estudo e participaram dos experimentos que foram realizados neste laboratório. À FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelo apoio financeiro ao projeto.

REFERÊNCIAS

- ARIF, T. et al. Produtos naturais- agentes antifúngicos derivados de plantas. **Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry**. v.81, p. 283-311, 2001.
- BEHLING, E.B. et al. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimento e Nutrição Araraquara**. v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BEZERRA, D. A. C. et al. **Estudo fotoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Willd).Poiret e *Piptadenia stipulaceae* (Benth.) Ducke**. 2008. Dissertação mestrado em zootecnia- Programa de pós-graduação em zootecnia da Universidade Federal de Campina Grande, Patos.
- BOGO, D. **Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de compostos de líquens**. 2012. 110p. Tese de pós graduação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo grande.
- BRANDÃO, H.N. et al; Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BYLKA, W. et al. Flavonóides naturais como agentes antimicrobianos. **Mylan School of Pharmacy**. V. 7. P.24-31, 2004.
- CHUNG, M.C. et al. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**. V.22, n.1, pp.75-84, 1999.
- GRUPTA, R. et al. A. *Mimosa pudica* L. (Laajvanti): An overview. **Pharmacognosy Reviews**. v. 6, p.115, 2012.
- HANNAHAN, D., WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, p. 57-70, 2011.
- Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. **O câncer e seus fatores de risco: o que a educação pode evitar**. 2º edição; Rio de Janeiro, 2013.
- JOSEPH, B. et al. Farmacologia e usos tradicionais da *Mimosa pudica*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**. v. 6. p.115–124, 2013.
- LEAL, T.A.T. **Estudo fitoquímico biomonitorado de *mimosa tenuiflora* (willd.) poir. por avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante**. 2018. 101p. Dissertação (Mestrado- Área de Concentração em Química Aplicada). Departamento de Química, Universidade do Estado da Bahia, Bahia.

LOTUFO, L. V. et al. O. 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.

NAJARAN, Z.T. et al. Growth Inhibition and Apoptosis Induction by *Vincetoxicum pumilum* Decne. on HL-60 and K562 Leukemic Cell Lines. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, 2016, 11(2): e29370.

OLIVEIRA, D.M.T. Morfologia de plântulas e plantas jovens de 30 espécies arbóreas de Leguminosae. **Acta Botanica. Brasilica**. v.13, n.3, p.263-269, 1999.

OLIVEIRA, L.B. **Avaliação de atividades farmacológicas de Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas - Avaliação e Obtenção de Produtos Naturais e Bioativos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

RIVIERA-ARCE, E. et al. Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosae tenuiflorae* cortex. **Journal of Ethnopharmacology** v.113, p. 400-408, 2007.

SIEGEL, R. L et al. Cancer statistical. **CA: A Cancer Journal of Clinics**. v.66, p. 7-30, 2016.

SOUZA, M.V.N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**. v. 27; n. 2, p. 308-312, Rio de Janeiro, 2004.

SOUZA, R.S.O et al. Jurema-Preta: uma revisão de seu uso tradicional, fitoquímica e farmacologia. **Arquivo Brasileiro de Biologia e Tecnologia**. v. 51, n. 5, p. 937-947, outubro de 2008, Curitiba.

SWIFT, L.P. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. **Cancer Research Hauppauge**. v.66. p. 4863-4871, 2006.

2. Proposta de submissão

2.1 Revista: REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

2.2 Regras para Submissão:

- **Escopo e política**

A **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - RBPM** é publicação trimestral, exclusivamente eletrônica a partir de 2012, e destina-se à divulgação de trabalhos científicos originais, revisões bibliográficas, e notas prévias, que deverão ser inéditos e contemplar as grandes áreas relativas ao estudo de plantas medicinais. Manuscritos que envolvam ensaios clínicos deverão vir acompanhados de autorização da Comissão de ética pertinente para realização da pesquisa. Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol, sendo obrigatória a apresentação do resumo em português e em inglês, independente do idioma utilizado. Os artigos devem ser enviados por e-mail: rbpm.sbp@gmail.com, com letra Arial 12, espaço duplo, margens de 2 cm, em "Word for Windows". Os artigos, em qualquer modalidade, não devem exceder 20 páginas. No e-mail, enviar telefone para eventuais contatos urgentes.

Para a publicação, os artigos aprovados submetidos à RBPM a partir de 1º de Abril de 2013 (inclusive), terão custo de tramite de 300 reais (trezentos reais) a ser efetivado pelos autores/responsáveis somente na ocasião do recebimento da carta de aceitação do artigo, quando receberão o respectivo boleto e instruções para o pagamento.

- **Forma e preparação de manuscritos**

REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS E NOTAS PRÉVIAS

Revisões e Notas prévias deverão ser organizadas basicamente em: Título, Autores, Resumo, Palavras-chave, Abstract, Keywords, Texto, Agradecimento (se houver) e Referência Bibliográfica.

Atenção especial deve ser dada aos artigos de Revisão evitando a citação Ipsi-litteris de textos, que configura plágio por lei.

ARTIGO CIENTÍFICO

Os artigos deverão ser organizados em:

TÍTULO: Deverá ser claro e conciso, escrito apenas com a inicial maiúscula, negrito, centralizado, na parte superior da página. Se houver subtítulo, deverá ser em seguida ao título, em minúscula, podendo ser precedido de um número de ordem em algarismo romano. Os nomes comuns das plantas medicinais devem ser seguidos pelo nome científico (binômio latino e autor) entre parênteses.

AUTORES: Começar pelo último sobrenome dos autores por extenso (nomes intermediários somente iniciais, sem espaço entre elas) em letras maiúsculas, 2 linhas abaixo do título. Após o nome de cada autor deverá ser colocado um número sobrescrito que deverá corresponder ao endereço: instituição, endereço da instituição (rua e número ou Caixa Postal, cidade, sigla do estado, CEP, e-mail). Indicar o autor que deverá receber a correspondência. Os autores devem ser separados com ponto e vírgula.

RESUMO: Deverá constar da mesma página onde estão o título e os autores, duas linhas abaixo dos autores. O resumo deverá ser escrito em um único parágrafo, contendo objetivo, resumo do material e método, principais resultados e conclusão. Não deverá apresentar citação bibliográfica.

Palavras-chave: Deverão ser colocadas uma linha abaixo do resumo, na margem esquerda, podendo constar até cinco palavras.

ABSTRACT: Apresentar o título e resumo em inglês, no mesmo formato do redigido em

português, com exceção do título, apenas com a inicial em maiúscula, que virá após a palavra ABSTRACT.

Key words: Abaixo do Abstract deverão ser colocadas as palavras-chave em inglês, podendo constar até cinco palavras.

INTRODUÇÃO: Na introdução deverá constar breve revisão de literatura e os objetivos do trabalho. As citações de autores no texto deverão ser feitas de acordo com os seguintes exemplos: Silva (1996); Pereira & Antunes (1985); (Souza & Silva, 1986) ou quando houver mais de dois autores Santos et al. (1996).

MATERIAL E MÉTODO (CASUÍSTICA): Deverá ser feita apresentação completa das técnicas originais empregadas ou com referências de trabalhos anteriores que as descrevam. As análises estatísticas deverão ser igualmente referenciadas. Na metodologia deverão constar os seguintes dados da espécie estudada: nome popular; nome científico com autor e indicação da família botânica; nome do botânico responsável pela identificação taxonômica; nome do herbário onde a exsicata está depositada, e o respectivo número (Voucher Number); época e local de coleta, bem como, a parte da planta utilizada.

RESULTADO E DISCUSSÃO: Poderão ser apresentados separados, ou como um só capítulo, contendo a conclusão sumarizada no final.

AGRADECIMENTO: deverá ser colocado neste capítulo (quando houver).

REFERÊNCIA: As referências devem seguir as normas da ABNT 6023 e de acordo com os exemplos:

Periódicos:

AUTOR(ES) separados por ponto e vírgula, sem espaço entre as iniciais. Título do arti-

go. **Nome da Revista, por extenso**, volume, número, página inicial-página final, ano.

KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v.186, n.2, p.267-73, 1989.

Livros:

AUTOR. **Título do livro**. Edição. Local de publicação: Editora, Ano. Total de páginas.

MURRIA, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A. **The natural coumarins**: occurrence, chemistry and biochemistry. 3.ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1982. 702p.

Capítulos de livros:

AUTOR(ES) DO CAPÍTULO. Título do Capítulo. In: AUTOR (ES) do LIVRO. **Título do livro**: subtítulo. Edição. Local de Publicação: Editora, ano, página inicial-página final.

HUFFAKER, R.C. Protein metabolism. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant physiology**: a treatise. Orlando: Academic Press, 1983. p.267-33.

Tese ou Dissertação:

AUTOR. **Título em destaque**: subtítulo. Ano. Total de páginas. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, Universidade, Local.

OLIVEIRA, A.F.M. **Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil**. 1995. 125p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Trabalho de Evento:

AUTOR(ES). Título do trabalho. In: Nome do evento em caixa alta, número, ano, local. **Tipo de publicação em destaque**... Local: Editora, ano. página inicial-página final.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso

popular no Cerrado. In: INTERNATIONAL SAVANNA SYMPOSIUM, 3., 1996, Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa, 1996. p.169-71.

Publicação Eletrônica:

AUTOR(ES). Título do artigo. **Título do periódico em destaque**, volume, número, página inicial-página final, ano. Local: editora, ano. Páginas. Disponível em: <<http://www.....>>.

Acesso em: dia mês (abreviado) ano. PEREIRA, R.S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-8, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 18 abr. 2005.

Não citar resumos e relatórios de pesquisa, a não ser que a informação seja muito importante e não tenha sido publicada de outra forma. Comunicações pessoais devem ser colocadas no rodapé da página onde aparecem no texto e evitadas se possível. Devem ser também evitadas citações do tipo: Almeida (1994) citado por Souza (1997).

TABELAS: Devem ser inseridas no texto, com letra do tipo Arial 10, espaço simples. A palavra TABELA (Arial 12) deve ser em letras maiúsculas, seguidas por algarismo arábico; já quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Tabela).

FIGURAS: As ilustrações (gráficos, fotográficas, desenhos, mapas) devem ser em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico, Arial 12, e inseridas no texto. Quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Figura). As legendas e eixos devem ser em Arial 10, enviadas em arquivos separados, com resolução 300 DPI, 800x600, com extensão JPG ou TIFF, para impressão de publicação.

Processo de avaliação: Os manuscritos são analisados por, pelo menos, dois pareceristas, segundo um roteiro de análise baseado principalmente no conteúdo científico. Os pareceristas recomendarão a aceitação com ou sem necessidade de retornar; recusa, ou sugerir reformula-

ções, e que, neste caso, o artigo reformulado retornará ao parecerista até que a avaliação seja concluída. Quando no mínimo 2 pareceristas aprovarem, sem necessidade de retornar, o artigo estará pronto para ser publicado e o autor receberá a carta de aceite bem como as instruções para pagamento dos custos de tramite (R\$300 reais)*. Os nomes dos pareceristas permanecerão em sigilo, omitindo-se também perante estes os nomes dos autores.

* Somente os artigos aprovados que foram submetidos a partir de 1º de abril de 2013 terão custo para publicação.

Direitos autorais: Ao encaminhar um manuscrito para a RBPM os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as Memórias.

ATENÇÃO: Artigos que não estiverem de acordo com essas normas serão devolvidos.

Observação: São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos. Contudo, reserva-se ao Conselho Editorial, o direito de sugerir ou solicitar modificações que julgarem necessárias.