

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE COMPOSTOS ISOLADOS DO RIZOMA DE *Limonium brasiliense*

Natalia Castelhana de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Raquel Garcia Isolani, Naiara Cássia Gancedo (Coorientadora), João Carlos Palazzo de Mello (Orientador), e-mail: mello@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Câncer de próstata, estudo *in vitro*, Plumbaginaceae.

Resumo:

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, é uma espécie vegetal conhecida popularmente como “baicuru, guaicuru ou guaicurá” e, utilizada na medicina popular para regularizar os períodos menstruais. Estudos científicos comprovaram que extratos, frações, subfrações e/ou compostos isolados dos rizomas de *L. brasiliense*, apresentam atividade antioxidante, antibacteriana, imunomoduladora e antineoplásica para leucemia. Este trabalho objetivou avaliar *in vitro* a atividade antiproliferativa dos compostos isolados da fração semipurificada do rizoma de *L. brasiliense* em linhagem celular de câncer de próstata (PC-3). Para isso, o método de determinação de viabilidade celular (MTT) foi utilizado. Os resultados demonstraram que as substâncias epigalocatequina-3-O-galato e samarangenina B apresentaram citotoxicidade frente à linhagem neoplásica PC-3, destacando-se a samarangenina B que obteve melhor capacidade antiproliferativa ($IC_{50} = 62,80 \pm 1,399 [2,23\%] \mu M/mL$).

Introdução

A espécie vegetal *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae é conhecida popularmente por “baicuru, guaicuru ou guaicurá”. É a única espécie nativa do Brasil, do gênero *Limonium*, e é encontrada em estados da região sul e sudeste do país.

Os rizomas de *L. brasiliense* são utilizados na medicina popular por sua ação antimicrobiana, para regularizar os períodos menstruais, por ter ação anti-inflamatória, para tratar inflamações do útero e ovário, dismenorrea e corrimentos, e por sua atividade antioxidante. Antonelli-Ushirobira *et al.* (2015) comprovaram que o extrato bruto dos rizomas de *L. brasiliense* apresentou baixa ou nenhuma toxicidade *in vivo*, conferindo-lhes um possível potencial de utilização como um novo fitoterápico. Blainski *et al.* (2017) avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de *L.*

brasiliense, obtendo bons resultados contra bactérias Gram-positivas resistentes. Cordeiro (2017) evidenciou que o extrato, frações, subfrações e a substância isolada Samarangenina A de *L. brasiliense* apresentaram atividade imunomoduladora, bacteriostática e antineoplásica para leucemia. Este trabalho empregou o método de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) para avaliação da atividade antiproliferativa da linhagem celular de câncer de próstata (PC-3), tratada com epigallocatequina-3-O-galato e samarangenina B, substâncias isoladas do rizoma de *L. brasiliense*.

Materiais e métodos

Cultura de células

Para a realização dos experimentos foi utilizada a linhagem epitelial neoplásica humana de próstata, PC-3 (ATCC CRL-1435), cultivada em garrafas de cultivo celular de 75 cm², em 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco®), contendo L-glutamina e vermelho fenol, suplementado com 2,0 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Synth®) e 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) (Gibco®). A linhagem foi mantida em 1% (v/v) de solução antibiótico-antimicótico (Gibco®), contendo 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B, sob condições de incubação de 37,0 °C em atmosfera úmida com 5,0% de CO₂.

Atividade metabólica e viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT com modificações (MOSMANN, 1983). O método de MTT, baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio (MTT) por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas, dando origem, intracelularmente, a cristais azuis (Formazan). A redução do MTT ocorre por meio de uma reação enzimática dependente de NADH, realizada principalmente pela enzima succinato desidrogenase. Para a realização do método, as células foram tripsinizadas (0,25% Tripsina-0,1%EDTA), ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de SBF e ausência de antibiótico. Foram utilizadas células em fase exponencial de crescimento e com viabilidade ≥90%, determinada pela técnica de azul de Trypan, em câmara de Neubauer. Em seguida, 100 µL da concentração celular (2,5×10⁵ células/mL) foram transferidos para placa de cultura de 96 poços, e mantidas por 24 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂ e umidade.

Decorrido o tempo de estabilização, o meio de cultura foi substituído e a monocamada celular foi tratada com 200 µL de cada composto em diferentes concentrações (250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,90, 1,95 e 0,98 µM), diluídos em meio desprovido de SBF e antibiótico. As placas foram incubadas por 48 h a 37,0 °C em 5,0% de CO₂ e umidade. Ao término do tempo de tratamento, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 200

μL de MTT (0,5 mg/mL). Após 4 h, o sobrenadante foi removido e os cristais de Formazan foram solubilizados com 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorvância foi mensurada em espectrofotômetro (EPOCH 2) à 570 nm. A porcentagem de destruição celular foi calculada de acordo com a equação:

$$(\%) \text{ de destruição celular} = 1 - (\text{ABS}_{\text{Tratamento}} / \text{ABS}_{\text{CN}}) \times 100$$

Onde: $\text{ABS}_{\text{Tratamento}}$ é a absorvância do tratamento e ABS_{CN} é a absorvância do controle negativo. Os valores do controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em três dias distintos e em replicatas técnicas de cada condição. Com os resultados, foi possível determinar as concentrações necessárias para inibir 50% (CI_{50}) e 90% (CI_{90}) da proliferação celular.

Resultados e Discussão

As substâncias isoladas de *L. brasiliense*, epigalocatequina-3-O-galato e samarangenina B, foram avaliadas quanto a citotoxicidade em linhagem humana de câncer de próstata (PC3), e os valores de CI_{50} e CI_{90} foram determinados (Tabela 1).

Tabela 1. Citotoxicidade das substâncias isoladas de *Limonium brasiliense*

Substância Isolada	CI_{50} (PC-3) ($\mu\text{M}/\text{mL}$) \pm DP[CV%]	CI_{90} (PC-3) ($\mu\text{M}/\text{mL}$) \pm DP[CV%]
Epigalocatequina-3-O-galato	117,90 \pm 5,459[4,63%]	>250
Samarangenina B	62,80 \pm 1,3999[2,23]	>250

CI_{50} : concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular; CI_{90} : concentração necessária para inibir 90% da proliferação celular; CV: coeficiente de variação; DP: desvio padrão.

Conforme a tabela acima, podem ser consideradas boas as atividades citotóxicas apresentadas pelas substâncias samarangenina B e epigalocatequina-3-O-galato para a linhagem PC3. Destacando-se a samarangenina B, substância que obteve melhor capacidade antiproliferativa, ou seja, menor valor de IC_{50} (IC_{50} = 62,80 \pm 1,3999[2,23] $\mu\text{M}/\text{mL}$).

A possível atividade antiproliferativa observada nos compostos isolados de *L. brasiliense* frente a linhagem PC3, pode ser justificada pelas atividades promissoras já constatadas em outros trabalhos para outras espécies de *Limonium*. Além disso, as substâncias isoladas epigalocatequina-3-O-galato e samarangenina B apresentam atividade antioxidante já comprovada na literatura. Substâncias que agem como antioxidantes têm a capacidade de controlar a formação de radicais livres, compostos relacionados com o surgimento do câncer. Assim, a possível ação das substâncias samarangenina B e epigalocatequina-3-O-galato em promover diminuição no crescimento e/ou morte celular pode estar relacionada com esta capacidade antioxidante.

Conclusões

De acordo com as análises realizadas, pode-se confirmar que as substâncias isoladas de *L. brasiliense*, epigalocatequina-3-O-galato e samarangenina B apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem neoplásica PC-3, com destaque para a samarangenina B, substância que apresentou melhor atividade antiproliferativa. Dessa forma, estudos complementares devem ser realizados, permitindo uma melhor compreensão da seletividade e do possível mecanismo de ação dessa substância no ciclo celular da linhagem tumoral avaliada.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro. À coorientadora Naiara Gancedo e ao prof. João Mello pela oportunidade e por toda aprendizagem. À doutoranda Raquel Garcia Isolani por ter fornecido a substância samarangenina B.

Referências

BLAINSKI, A. *et al.* Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrugresistant bacteria using a statistical mixture design. **Journal of Ethnopharmacology**, v.198, p.313-323, 2017.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M. *et al.* Acute toxicity and long-safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, p.293-298, 2015.

CORDEIRO, M.F. **Avaliação das atividades imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de rizomas de *Limonium brasiliense*, sementes de *Paullinia cupana* e cascas do caule de *Trichilia catigua*.** Tese (Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica), Universidade Federal de Pernambuco. 142f., 2017.

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.