



RESULTADOS PRELIMINARES DE ENSAIOS BIOLÓGICOS COM EXTRATOS DE *Jodina rhombifolia* Hook et Arn. COM CÉLULAS TUMORAIS

COSTA, Juliana Hartleben da¹; SILVA, Viviane Maciel²; SANTOS, Bruna Coi dos³; SARAÇOL, Juliana Sassi⁴; OLIVEIRA, Simone Gomes Dias⁵; DEL PINO, Francisco Augusto Burkert⁶.

¹Bolsista PIBIC -FAPERGS e Graduada de Licenciatura em Ciências Biológicas – IB/UFPeI

²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ/UFPeI

³Graduada de Licenciatura em Química – IQG/UFPeI

⁴Graduada de Licenciatura em Ciências Biológicas – IB-UFPeI

⁵Graduada de Odontologia - UFPeI

⁶Professor do Departamento de Bioquímica – IQG/UFPeI

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. juhartleben@ibest.com.br

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são um tema recorrente na pauta da ciência brasileira e muitos químicos e farmacólogos brasileiros têm realizado estudos com plantas medicinais. Elas são, tradicionalmente, fontes importantes de matéria-prima para a indústria farmacêutica, embora a química sintética também produza novas substâncias bioativas. Técnicas combinatoriais expandem o número dos compostos disponíveis para testes, gerando uma quantidade relativamente elevada de produtos naturais entre as drogas disponíveis no mercado.

Recentemente, ensaios com produtos naturais têm demonstrado atividade biológica relevante e pronunciada, bem como resultados adversos aos seus correspondentes sintéticos, os alopáticos. São observadas também diferenças entre as propriedades químicas e estruturais dos compostos químicos naturais. Estas diferenças estruturais devem ser consideradas também entre os próprios produtos naturais, quando advindo de fontes diferentes, especialmente no desenvolvimento de princípios ativos da biodiversidade, relacionados a fatores como o clima, as safras e as espécies.

Um dos problemas na comercialização de fitoterápicos no Brasil está na dificuldade de exportação devido à falta do status de “medicamento ético” que lhe garanta eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para a segurança do usuário.

Muitos exemplos de plantas medicinais da biota brasileira poderiam ser citados, entretanto, a maioria das plantas medicinais comercializadas no Brasil é introduzida. Assim, as plantas medicinais endêmicas ainda são pouco conhecidas constituindo um fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento.

Neste contexto, o químico de produtos naturais não só pode estar envolvido no isolamento e identificação dos constituintes ativos, como também desenvolvendo pesquisas na tentativa de validação de métodos analíticos modernos visando o controle de qualidade destas plantas.

Em contrapartida, os inconvenientes ao uso de produtos naturais quando se busca produzi-los em grande escala esta na incerteza em se obter quantidades suficientes de material, na variabilidade da composição das amostras, nas diferenças de atividades biológicas e na ausência de padrões que auxiliem o reconhecimento de determinadas estruturas químicas contidas nos extratos brutos.

Uma das alternativas para minimizar os riscos à introdução de novos produtos na indústria farmacêutica é isolar os princípios ativos dos produtos naturais ainda brutos, e encurtar os tempos de pesquisa, o que conseqüentemente aumenta o grau de especialização requerido para estas. As descobertas e a manutenção de grupos exploratórios necessitam de dispendiosos incentivos para o desenvolvimento de seus programas.

Neste intuito, o grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica Clínica do departamento de Bioquímica/UFPel, em parceria com o Laboratório de Cultivo Celular do departamento de Fisiologia e Farmacologia-IB/UFPel, buscam purificar e caracterizar extratos brutos de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn, que em pesquisas anteriores vem demonstrando atividade biológica significativa, frente a linhagens de células tumorais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Processo de Produção dos Extratos de *Jodina rhombifolia* Hook et Arn:

Após seco e moído, o material vegetal da planta foi armazenado em uma sala de desumidificação (umidade do ar 45%), até o momento da extração.

Foram pesados 30g de material vegetal em balança analítica, após colocada em um béquer de 1000 ml. Foi adicionada à amostra 600 ml de água deionizada em ebulição, e a mistura macerada sob agitação magnética por uma hora. A mistura resultante foi filtrada a vácuo, e o filtrado foi recolhido e identificado como Extrato Aquoso (JRA).

A parte sólida, retida no filtro, foi novamente transferida para o béquer e a ela foram adicionados 300 ml de álcool metílico destilado, o sistema foi mantido sob agitação magnética por 8 horas. Ao final do período a mistura foi filtrada, e novamente foi adicionado igual volume de metanol, o procedimento foi repetido uma vez mais. Ao final das três extrações sucessivas, os extratos foram homogeneizados e identificados como Extrato Metanólico (JRM).

Após o procedimento o material sólido foi estabilizado e descartado. Os extratos obtidos foram secos e armazenados sob refrigeração até o momento dos ensaios biológicos. O extrato JRA foi liofilizado (procedimento destinado a remoção de solventes de alto ponto de ebulição), e o extrato JRM foi seco em evaporador rotativo sob vácuo e temperatura adequados.

Processo de Cultivo Celular e Ensaio Biológico:

As células da linhagem MCF-7 e NIH-3T3 foram cultivadas em placas com 96 cavidades com meio de cultura DEMEM e suplementado com 10% de Soro bovino Fetal (SBF) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C., e então pré-incubadas por 24h (Tempo T₀). Posteriormente, as células foram expostas a cinco diluições crescentes dos extratos e incubado por mais 48h. As determinações finais do crescimento

celular foram realizadas após fixação das células com TCA, seguido de coloração com Sulforrodamina B (SRB). Para remover o corante, o cultivo foi lavado com ácido acético e solubilizado com Tris base (tris hidroximetil aminometano 10mM). Posteriormente, determinou-se a densidade óptica em um Espectrofotometro com Leitor de Placa ELISA a 492nm . Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gráficos 1, 2, 3 e 4 mostram os resultados preliminares dos ensaios biológicos, frente aos extratos Aquosos e Metanólicos de *Jodina rhombifolia*, frente às linhagens celulares tumoral (MCF-7) e não tumorais (3T3 - Fibroblastos).

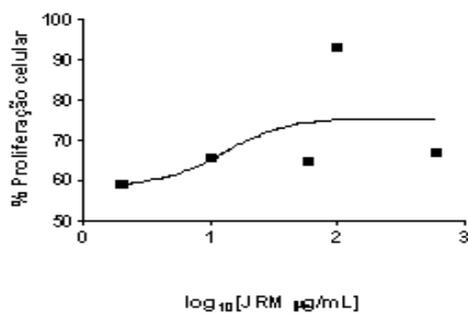


Gráfico 1. Extrato JRM em linhagem não tumoral 3T3.

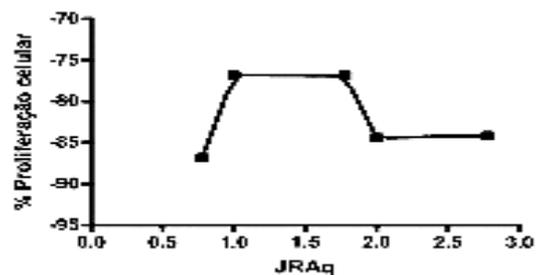


Gráfico 2. Extrato JRA em linhagem não tumoral 3T3.

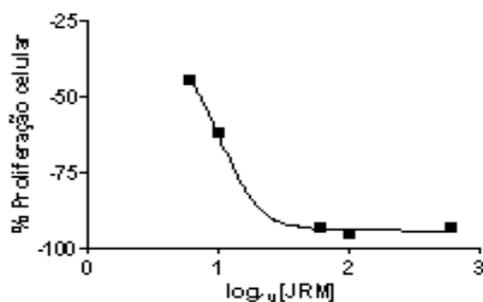


Gráfico 3. Extrato JRM em linhagem tumoral MCF-7.

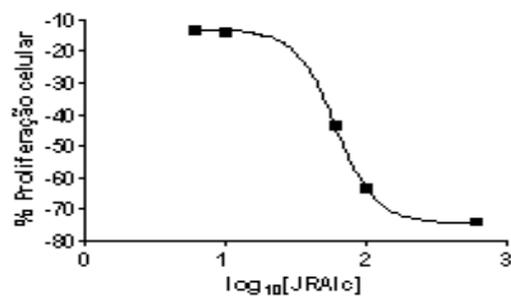


Gráfico 4. Extrato JRA em linhagem tumoral MCF-7.

Observando os gráficos acima podemos constatar que ambos os extratos produzidos (JRM – gráfico 1 e JRA – gráfico 2) quando submetidos ao ensaio biológico com linhagens de células não tumorais (Fibroblastos – 3T3), mostraram crescimento celular. Ou seja, os extratos não possuem atividade antineoplásica e/ou citotóxica nesta linhagem celular, permitindo o crescimento normal da célula, quando comparada ao grupo controle que não recebeu extrato, mas apenas meio de cultivo.

Comparando-os entre si, podemos observar também que o gráfico 1 apresenta uma proliferação celular mais linear em relação ao gráfico 2, embora, o primeiro tenha sido produzido a partir de um solvente mais tóxico que o segundo. Desta forma podemos concluir que o extrato era de fato isento de solvente orgânico.

Os gráficos 3 e 4 representam os mesmos extratos anteriores, agora testados frente a linhagens de células tumorais de carcinoma mamário (MCF-7), em ambos

foi constatada a presença da atividade biológica através da inibição do crescimento celular. O gráfico 4 (JRA em MCF-7) apresenta uma curva de dose resposta mais acentuada, em contrapartida, o percentual de redução celular foi menos significativo quando comparado ao gráfico 3 (JRM em MCF-7).

A partir do exposto, decidimos produzir apenas extratos metanólicos da *Jodina rhombifolia*, para serem usados na etapa de fracionamento.

Para o fracionamento, o extrato bruto foi dissolvido em metanol, o mesmo solvente utilizado como eluente da coluna. Depois de eliminada a região inerte da coluna, foi coletada 18 amostras de 40 ml cada, todas as amostras foram secas em evaporador rotativo, re-suspendidas em DMSO, diluídas em concentrações iguais as dos extratos brutos.

Atualmente estão sendo realizados ensaios biológicos com as frações dos extratos aquoso e metanólico de *Jodina rhombifolia* em ambas as linhagens celulares com a finalidade de isolar as frações ativas dos extratos brutos.

4. CONCLUSÕES

Houve inibição significativa das linhagens de células tumorais pesquisadas por ação dos extratos brutos obtidos. Espera-se agora isolar a fração ativa do extrato metanólico, para que, conhecendo sua composição seja pesquisada a viabilidade da produção do fármaco por via sintética.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SEIDL, P. R. Pharmaceuticals from Natural Products: Current Trends, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2002, 74, p. 145.
2. PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, 2002, 25, p. 45, 2002.
3. CAVALLA, D. Technology Providers and Integrators – A Virtual Architecture for Drug R&D? In: Bristol, J. A. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, 1998, 33, p. 365.
4. KUATE, S. P.; PÁDUA R. M.; EISENBEISS, W. F.; KREIS, W. Purification and characterization of malonyl-coenzyme A: 21-hydroxypregnane 21-O-malonyltransferase from leaves of *Digitalis purpurea* L. **Phytochemistry**, 2008, 69, p. 619.
5. YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, 2001, 24, p. 147.
6. XIE, G.; SCHEPETKIN, I. A.; SIEMSEN, D. W.; KIRPOTINA, L. N.; WILEY, J. A.; QUINN, M. Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartite*, **Phytochemistry**, 2008, 69, p. 1359.

6. AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos à agência CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de financiamento para execução deste projeto através do Edital Universal, além de bolsa PIBIC, e à

agência FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pela concessão de uma bolsa PIBIC.