



ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DO EXTRATO DA FOLHA DE *Mentha spicata* ASSOCIADA A *M. rotundifolia*.

BUENO, André¹; NEDEL, Fernanda² ; LUND, Rafael Guerra³; BEIRA, Fátima Tereza Alves⁴; DEL PINO, Francisco Augusto Burkert⁵.

¹ Acadêmico da Faculdade de Odontologia - UFPel

² Acadêmica da Faculdade de Odontologia - UFPel

³ Programa de Pós-Graduação em Odontologia – UFPel

⁴ Departamento de Fisiologia e Farmacologia – IB - UFPel

⁵ Departamento de Bioquímica – IQG - UFPel

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. deko10_621@hotmail.com
Universidade Federal de Pelotas – UFPel

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de medicamentos a partir de plantas fornece fontes importantes de novas drogas, muitas das quais foram aprovadas ou submetidas a testes para usos clínicos contra o câncer, a malária, doença de Alzheimer, HIV/AIDS, patologias pulmonares e outras doenças (Butler, 2004; Newman et al. 2003).

O gênero *Mentha* é pertencente à família Lamiaceae, que inclui também outras plantas produtoras de óleos comumente cultivadas como ‘manjeriço’, ‘sálvia’, ‘alecrim’, ‘manjerona’, ‘alfazema’ e ‘tomilho’ (Choudhury, 2006). A *Mentha spicata*, conhecida como ‘spearmint’, ‘hortelã-vilhoça’ ou ‘hortelã-peluda’, é utilizada em temperos, em gomas de mascar e pastas de dentes para conferir sabor e se tornou um componente comum nos chás indianos (Saleem et al., 2000). A *Mentha spicata*, vem sendo alvo de diversificadas pesquisas sobre os elementos que a compõem. Por tal motivo, pesquisadores do noroeste da Índia, observaram que as folhas de hortelã possuem elementos anticarcinogênicos, como o elemento químico Se (selênio) que, por si, só pode ser responsável por propriedades antineoplásicas (Choudhury, 2006,)

Mentha rotundifolia é um híbrido entre o *M. longifolia* (L.) e *M. suaveolens* Ehrh. Alguns autores têm considerado *M. rotundifolia* como um sinônimo de *M. suaveolens* (Kokkini & Papageorgiun, 1988). Brada (2006), relatou diversos quimiotipos na composição do óleo de *M. rotundifolia*. Um deles é particularmente rico em óxido de piperitenona, um monoterpene oxigenado, cujos efeitos

biológicos têm sido investigados.

O objetivo desse estudo é avaliar a citotoxicidade do extrato hexânico obtidos da folha da *M. spicata* e *M. rotundifolia*, em cultivo *in vitro* das linhagens celulares tumorais carcinoma de boca (KB) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e não tumoral, fibroblastos de camundongo (3T3) (grupo controle).

2. Materiais e Método

Todas as linhagens celulares foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro/RJ.

Plantas Medicinais

As espécies *M. spicata* e *M. rotundifolia* foram coletadas em terreno baldio, no Balneário dos Prazeres (Barro Duro), cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Para a preparação dos extratos, 100 g de material vegetal seco foi macerado com 1000mL de hexano P.A. (extrato hexânico), e submetido à agitação em 200rpm, à temperatura ambiente, por 3h. Subseqüentemente, o extrato foi filtrado e o resíduo da planta foi re-extraído com o solvente fresco utilizado na extração. O filtrado foi concentrado em aparelho rotavapor a vácuo e armazenado em cubas de aço inox para congelamento inicial a -20°C e, posteriormente, a -80°C.

O extrato foi diluído com Dimetilsulfóxido (DMSO), onde a concentração-mãe foi de 500 mg/mL. Então se procedeu às diluições obtendo concentrações a serem testadas que variaram de 10 a 400mg/mL.

Avaliação da atividade citotóxica dos extratos e frações nos cultivos celulares

Foram utilizadas placas de microcultivo com 96 cavidades. Na placa para testes, as células foram suspensas em 198 µL de meio de cultivo DMEM com 10% de SFB (soro fetal bovino) e incubadas durante 24h, a 37°C e 100% de umidade relativa. Após, uma das placas com as células foi exposta a 2 µL de cada uma das concentrações crescentes do extrato por 48 horas e comparadas a um grupo controle. Foram realizadas de 4 réplicas para cada concentração do extrato.

Então as células foram fixadas mediante a adição de 50µL de Ácido tricloroacético 50% aos 200 µL de meio de cultivo e incubadas em refrigerador a 4°C durante 1h. Em seguida, foram realizadas 5 lavagens das cavidades das placas c/ 200µL de água destilada deionizada, e depois colocadas para secar ao ar.

O ensaio colorimétrico foi realizado mediante a adição de 100µL de uma solução de sulforodamina B 0,4%p/v (com ácido acético 1%) em cada cavidade. A placa foi mantida em repouso durante 30min à temperatura ambiente e depois realizou-se cinco lavagens com ácido acético a 1%, deixando as mesmas secarem à temperatura ambiente. Depois, o corante foi ressolubilizado com 100µL de solução tampão Tris Base e homogeneizado através de um agitador de placas numa velocidade. Foi realizada a leitura da densidade óptica com aparelho espectrofotômetro leitor de placas de ELISA num comprimento de onda (λ) de 492nm.

3. Resultados e Discussões

A figura 1 mostra o efeito do extrato de hexânico da folha de Mentha M.spicata associada com M.rotundifolia sobre a linhagem celular de fibroblastos (NIH 3T3).

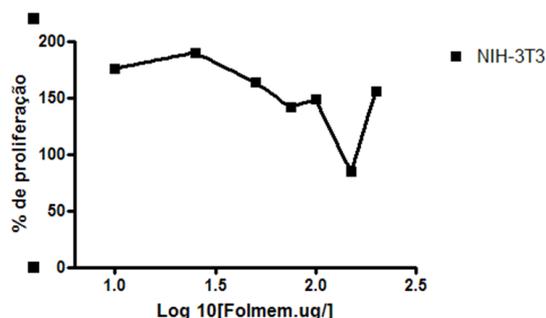


Figura 1 : Curva dose – resposta, do extrato hexânico da folha de M. spicata associada a M.rotundifolia com os fibroblastos (NIH 3T3)

Na figura 2 mostra a ação do mesmo extrato sobre a linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).

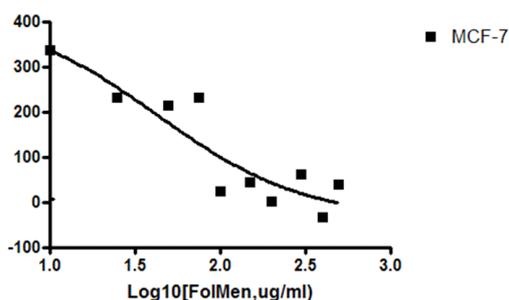


Figura 2 : Curva dose-resposta, do extrato de Mentha M. spicata associada a M. rotundifolia com células tumorais adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).

Na figura 3 descreve o efeito do extrato hexânico da folha de M. spicata associada M. rotundifolia sobre a linhagem de células tumorais carcinoma epidermóide de boca (KB).

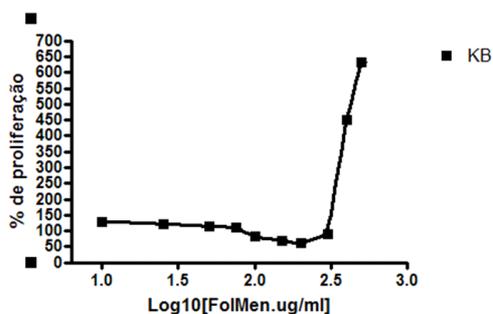


Figura 3 : curva dose-resposta do extrato da folha de M. spicata associada a M. rotundifolia sobre células

tumorais de carcinoma epidermóide de boca (KB).

No presente estudo, a escolha de usar estas duas espécies de *Mentha* está relacionada com suas propriedades individuais, sua abundância no Brasil e uso popular como remédio terapêutico. O extrato aquoso das folhas de *M. spicata* é usado para aliviar soluços, flatulência, tontura e como medicamento para inflamação, bronquite e para controlar vômitos durante a gravidez (Arumugam, 2008).

Muitos estudos têm avaliado os óleos essenciais de *M. spicata* e *M. rotundifolia*, especialmente em seus aspectos químicos (Brada 2006), porém pouco se sabe sobre a composição do extrato hexânico. No entanto, em estudo recente, foi observado que os extratos hexânicos e óleos essenciais têm composição química semelhante quanto a terpenos (Kordali 2009). Desta forma os óleos *M. spicata* contém monoterpenos, tais como: carvona (29-74%), limoneno (4-24%) e cireole (3-18%) (Arumugam 2008).

Outro estudo preliminar já realizado no Instituto de Química da UFPel em 2009, utilizando o mesmo banco de células, no entanto com um extrato hexânico da flor de *M. spicata* associada a *M. rotundifolia*, mostrou grande diferença nos resultados. O extrato da flor de *Mentha* teve ótimos resultados na ação antiproliferativa e morte celular em células tumorais de carcinoma epidermóide de boca (KB) e resultados não tão animadores sobre a linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) comparados ao resultados obtidos em nossa pesquisa.

4. Conclusão

Conclui-se que o extrato hexânico da folha de *M. spicata* associada a *M. rotundifolia* apresenta atividade antineoplásica sobre as linhagens celulares de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), carcinoma epidermóide de boca (KB) e fibroblastos de camundongo (3T3), contudo a ação sobre estas duas últimas linhagens foi bastante reduzida provocando apenas uma leve redução na proliferação celular. Faz-se necessário, entretanto, estudos com as frações do extrato para o isolamento e identificação dos componentes antineoplásicos.

5. Referências Bibliográficas

- ARUMUGAM, P., N. GAYATRI PRIYA, M. SUBATHRA AND A. RAMESH. Anti-inflammatory activity of our solvent fractions of ethanol extract of *Mentha spicata* L. investigated on acute and chronic inflammation induced rats. – a review **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 2008 ,26, p. 92—95.
- BRADA M.; BEZZINA M.; MARLIER M.; LOGNAY G.C. Chemical Composition of the Leaf Oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria.- a review **Journal of Essential Oil Research: JEOR**, Nov/Dec 2006.
- BUTLER, M.S., The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal**

of **Natural Productis** 69 (1), 2006 p.172.

CHOUDHURY R.P.; KUMAR A.; GARG A.N. Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006 Jun 7, 41, p.825-32.

CONFORTI F.; LOELE G., STATTI G.A.; MARRELLI M., RAGNO G.; MENICHINI F. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants, **Food and Chemical Toxicology**, 2008 Aug 11, p. 3325- 3332.

KOKKINI S. AND PAPAGEORGIOU V.P., Constituents of Essential Oils from *Mentha x rotundifolia* Growing Wild in Greece. **Plant Med.** 1988, 38, p. 166-167

KORDALI S, CAKIR A, AKCIN TA, METE E, AKCIN A, AYDIN T, KILIC H.

Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae).- a review **Journal Industrial Crops and Products** Volume 29, Issues 2-3, March 2009, p. 562-570.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002.-a review **Journal Natural Productis**, 66, 2003. p.1022–1037.

SALEEM M.; ALAM A.; SULTANA S. Attenuation of benzoyl peroxide-mediated cutaneous oxidative stress and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of mice with spearmint (*Mentha spicata*). **Food and Chemical Toxicology**, 2000, 38, p. 939-948.