



## POTENCIAL CITOTÓXICO DAS FRAÇÕES APOLARES DAS RAÍZES DE *KRAMERIA TOMENTOSA*

Maria Luísa Brodt Lemes<sup>1</sup>  
Sibele Ortiz<sup>2</sup>  
Ivana Grivicich<sup>3</sup>  
Marcela Silva dos Santos<sup>4</sup>  
Alexandre de Barros Falcão Ferraz<sup>5</sup>

### Resumo

A espécie *Krameria tomentosa* A. St.-Hil, popularmente conhecida como ratanha-de-nova-granada ou carrapicho-de-cavalo, é utilizada no combate a disenterias, estomatites, diarreias, hemorragias, hemorroidas e afecções da boca. A presença de lignoides nas espécies do gênero *Krameria* e sua elevada ação citotóxica, motivaram este estudo que buscou avaliar a atividade antiproliferativa do extrato bruto metanólico das raízes de *K. tomentosa* e suas frações frente a linhagens de células tumorais. A atividade antiproliferativa do extrato bruto metanólico e das frações foi determinada através do método da sulforrodamina B, utilizando linhagens de glioblastoma humano (U-251), carcinoma de ovário (OVCAR-3), carcinoma de mama (MCF-7) e fibroblasto (NHI-3T3), empregando como padrão o etoposídeo. Para a análise da constituição fitoquímica das raízes de *K. tomentosa* realizou-se os ensaios colorimétricos qualitativos do *screening* fitoquímico. Através da análise da atividade antiproliferativa, constatou-se que o extrato bruto metanólico e a fração metanólica apresentaram-se efetivos contra todas as linhagens celulares. Contudo, as frações clorofórmio e acetato de etila apresentaram um IC<sub>50</sub> próximo ao do etoposídeo frente as linhagens MCF-7 e OVCAR-3 além disso não induziram citotoxicidade nas células normais de fibroblasto. Através do *screening* fitoquímico observou-se a presença de flavonoides, lignoides, saponinas e taninos. Dentre estes, a presença dos lignoides nas frações apolares parece justificar a maior citotoxicidade encontrada. A baixa citotoxicidade destas frações frente a NHI-3T3 estimulam a continuidade deste trabalho buscando o isolamento dos lignoides presentes nestas frações.

Palavras chave: câncer; análise fitoquímica; lignoides.

### INTRODUÇÃO

O câncer atualmente representa a segunda causa de morte no Brasil, constituindo um dos maiores problemas de saúde pública (NOVAES; SCHOUT, 2009). Além disso, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima para o ano de 2015 a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma.

Em geral, a terapêutica antitumoral é considerada um dos grandes desafios do futuro, pois os tratamentos atuais são muito invasivos e apresentam diversos efeitos colaterais. Sob a perspectiva de que o câncer constitui um grave problema de saúde pública e devido aos tratamentos bastante invasivos, constata-se a importância dos estudos da química de produtos naturais. Uma vez que, a finalidade destas pesquisas é conhecer os constituintes químicos das

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Farmácia/ULBRA - Bolsista PROBIC/FAPERGS

<sup>2</sup>Aluna graduada em Farmácia/ULBRA

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

<sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA

<sup>5</sup>Professor do Curso de Farmácia/ULBRA e do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde/ULBRA (alexandre.ferraz@ulbra.br)

espécies vegetais, para que sejam encontradas novas fontes de substâncias farmacologicamente ativas que não sejam tão prejudiciais aos pacientes.

No decorrer dos anos, o uso de produtos naturais tornou-se uma importante ferramenta para a manutenção e recuperação da saúde, sendo vastamente empregados na medicina popular. À vista disso, relatos revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza plantas com finalidade terapêutica (FETROW e AVILA, 2000). Dessa maneira, a fitoquímica corroborou no desenvolvimento de fármacos altamente eficazes. Dentre os medicamentos antitumorais de origem vegetal, destaca-se a lignana denominada podofilotoxina e seus derivados semissintéticos o etoposídeo e o teniposídeo (BARBOSA FILHO, 2007).

A espécie *Krameria tomentosa* A. St.-Hil, popularmente conhecida como ratanha-de-nova-granada ou carrapicho-de-cavalo, é utilizada empiricamente no combate a disenterias, estomatites, diarreias, corrimentos vaginais, hemorragias, hemorroidas e afecções da boca (MADEIRO, 2012).

Para as espécies de *Krameria* tem sido relatada a presença de compostos fenólicos, como taninos e lignanas (ESTRADA et al., 2013). As lignanas destacam-se entre os constituintes químicos presentes na *K. tomentosa*, pois apresentam atividade antitumoral. Logo, devido esta atividade biológica escolheu-se a *K. tomentosa* para o estudo, que tem como objetivo avaliar a atividade antiproliferativa do extrato bruto metanólico das raízes de *K. tomentosa* e suas frações frente a linhagens de células tumorais.

## **METODOLOGIA**

**Material vegetal:** As raízes de *K. tomentosa* foram coletadas em fevereiro de 2013, no Município de Santa Rita, Estado de Pernambuco – Brasil.

**Preparo do extrato bruto:** As raízes de *K. tomentosa* foram submetidas a extração em aparelho soxhlet, na relação de 1:10 (planta/solvente). O extrato bruto metanólico, foi concentrado em rota evaporador sob temperatura inferior a 50°C.

**Preparo das frações:** Foi utilizado um novo material vegetal, na mesma proporção (1:10) planta/solvente, em aparelho soxhlet. O fracionamento ocorreu através do uso de solventes em ordem crescente de polaridade (clorofórmio, acetato de etila e metanol). Cada fração foi isoladamente concentrada em aparelho de evaporação rotativo, sob temperatura inferior a 50°C.

**Análise fitoquímica:** A identificação dos constituintes ativos presentes nas amostras (alcaloides, cardiotônicos, cumarinas, flavonoides, lignanas, quinonas, saponinas e taninos), foi efetuada com as raízes trituradas de *K. tomentosa*, seguindo a técnica descrita por Falkenberg; Santos; Simões (2007). Os testes para detecção dos constituintes do metabolismo secundário foram realizados através de reações gerais: flavonoides (Reação da cianidina), taninos (precipitação com solução de gelatina), cumarinas (KOH / UV 365 nm), saponinas (índice de espuma), alcalóides (precipitação com reagentes de Bertrand, de Bouchardat, de Dragendorff e de Mayer), antraquinonas (reação de Borntraeger), cardiotônicos (Reação de Kedde; Reação de Liebermann-Burchard; Reação de Keller- Kiliani) e lignanas (cromatografia em camada delgada (CCD) com sistema eluente 90:10 clorofórmio/metanol e revelador: reagente ácido sulfúrico-vanilina). Para a confirmação dos resultados qualitativos, foi realizada uma análise cromatográfica utilizando sistemas eluentes e reveladores específicos propostos por Wagner e Bladt (1996).

**Avaliação da atividade antiproliferativa:** A análise da atividade antiproliferativa do extrato bruto metanólico e das frações foi determinada através do método da sulforrodamina B (SRB), utilizando linhagens de glioblastoma humano (U-251), carcinoma de ovário (OVCAR-3), carcinoma de mama (MCF-7) e fibroblasto (NHI-3T3), tendo como padrão o etoposídeo. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorvância foram utilizados para determinar o potencial de inibição de crescimento celular,

através dos valores de IC<sub>50</sub> (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento celular) (SKEHAN et al., 1990; SAMPAIO, 2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do estudo fitoquímico das raízes de *Krameria tomentosa*, evidenciou-se nos testes qualitativos e colorimétricos a presença de flavonoides, lignanas, saponinas e taninos (tabela 1). Por conseguinte, alcaloides, cardiotônicos, cumarinas e quinonas não foram detectados nas avaliações executadas.

Tabela 1- Resultados do *screening* fitoquímico

Classes Químicas	Resultados
Alcaloides	Negativo
Cardiotônicos	Negativo
Cumarinas	Negativo
Flavonoides	Positivo
Lignanas	Positivo
Quinonas	Negativo
Saponinas	Positivo
Taninos	Positivo

No estudo, com a realização de uma cromatografia em camada delgada (CCD), houve a verificação positiva de lignanas no extrato bruto metanólico das raízes de *K. tomentosa*. Desse modo, o resultado adquirido está de acordo com relatos na literatura, em consequência de, nas raízes de *K. tomentosa*, já terem sido isoladas neolignanas: eupomatenoide, ottomentosa, sobralina e 2- (2',4' -diidroxifenil) - 5 (E)-propenilbenzofurano (MADEIRO, 2012).

Nos testes também se evidenciou a presença de saponinas. Segundo Schenkel, Gosmann e Athayde (2007), saponinas apresentam distribuição diversificada no reino vegetal, predominantemente encontradas nas famílias Agavaceae, Araliaceae, Caryophyllaceae, Liliaceae, Primulaceae e Polygalaceae. Em descrições na literatura, não consta a presença de saponinas na família Krameriaceae. Porém, justifica-se a divergência entre o resultado encontrado e o que consta na literatura, o fato dessa família ser pouco estudada.

Recentemente Brokamp et al. (2012) e Estrada et al. (2013) descreveram a presença de taninos nas raízes de *K. lappacea* e *K. erecta*, respectivamente. Estes relatos estão de acordo com o resultado positivo encontrado no ensaio para detecção da presença de taninos nas raízes de *K. tomentosa*.

Na análise da atividade antiproliferativa constatou-se que as frações clorofórmio e acetato de etila apresentaram um IC<sub>50</sub> próximo ao do etoposídeo frente as linhagens MCF-7 e OVCAR-3 além disso não induziram citotoxicidade nas células normais de fibroblasto (tabela 2). Logo, propõe-se que as lignanas estejam presentes nessas frações menos polares, pois nos ensaios realizados elas agiram contra a proliferação de células com atividade desordenada. Além disso, Madeiro (2012) realizou o isolamento e a identificação de neolignanas como ottomentosa e diidrocarinatidina, a partir da fração hexânica e clorofórmica obtidas do extrato bruto etanólico das raízes desta espécie.

Tabela 2 - Resultados do potencial de inibição do crescimento celular (IC<sub>50</sub>; média ± desvio padrão; n = 6)

Amostra	U-251	OVCAR-3	MCF-7	NHI-3T3
Extrato bruto metanólico	34,8 ± 3,6	70,5 ± 3,7	32,0 ± 4,9	64,17 ± 5,8
Fração clorofórmio	OR	16,2 ± 1,1	15,2 ± 2,3	OR
Fração acetato de etila	OR	12,4 ± 1,6	20,1 ± 4,7	OR
Fração metanólica	19,3 ± 4,2	31,2 ± 0,5	28,7 ± 3,6	66,3 ± 2,1
Etoposídeo	5,9 ± 1,0	10,3 ± 2,1	3,5 ± 0,8	22,5 ± 2,5

Entretanto, observou-se que o extrato bruto metanólico e a fração metanólica apresentaram-se efetivos contra todas as linhagens celulares. Sendo as únicas amostras ativas frente as linhagens de glioblastoma humano e fibroblasto. Portanto, sugere-se que os compostos responsáveis por esta ação estejam presentes na fração metanólica. A literatura contribui para esse resultado, já que também foi descrita atividade antiproliferativa para o extrato bruto metanólico de *K. erecta* frente à linhagem normal de tecido conjuntivo subcutâneo (L929) (ESTRADA et al., 2013). A presença de saponinas encontrada no *screening* fitoquímico também pode estar relacionada ao efeito encontrado nestas frações. Devido sua característica química, compostos desta classe fitoquímica só podem estar presentes no extrato bruto e na fração metanólica. Além do mais, saponinas isoladas de *Camassia leichtlinii*, apresentaram citotoxicidade frente a células humanas normais de fibroblastos gengivais (SPARG; LIGHT; STADEN, 2004).

## CONCLUSÕES

Através da análise da atividade antiproliferativa, constata-se que o extrato bruto metanólico e a fração metanólica apresentam-se efetivos contra todas as linhagens celulares.

As frações clorofórmio e acetato de etila apresentam um IC<sub>50</sub> próximo ao do etoposídeo frente as linhagens MCF-7 e OVCAR-3, além disso não induzem citotoxicidade nas células normais de fibroblasto.

Por meio do *screening* fitoquímico observa-se a presença de flavonoides, lignoides, saponinas e taninos.

Justifica-se a maior citotoxicidade encontrada nas frações apolares em virtude da presença dos lignoides. A baixa citotoxicidade destas frações frente a NHI-3T3 estimula a continuidade deste trabalho, que busca o isolamento dos lignoides presentes nestas frações.

## REFERÊNCIAS

BARBOSA FILHO, J. M. Lignananas, neolignananas e seus análogos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. d.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2007, p. 557-575.

BROKAMP, G.; DOSTERT, N.; CACERES, F.; WEIGEND, M. Parasitism and haustorium anatomy of *Krameria lappacea* (Dombey) Burdet & B.B. Simpson (Krameriaceae), an

endangered medicinal plant from the Andean deserts. **Journal of Arid Environments**. v.83, p. 84-100, 2012.

ESTRADA, M. J.; CONTRERAS, C. V.; ESCOBAR, A. G.; CANCHOLA, D. S.; VÁZQUEZ, R. L.; SANDOVAL, C. O.; HERNÁNDEZ, A. B.; ZEPEDA, R. E. R. in vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, México, v.13, p. 1-8, 2013.

FALKENBERG, M. B., SANTOS, R. I., SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica, In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. d.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC /Editora da UFRGS, 2007, p. 229-246.

FETROW, C.; AVILA, J.R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Guanabara Koogan, p. 743, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde. Estimativa / 2014 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

MADEIRO, S. A. L. New neolignans from *Krameria tomentosa* A. St.-Hil. 2012. 143p. Dissertação de Pós Graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, 2012.

NOVAES, H. M. D.; SCHOUT, D. Epidemiologia do Câncer. p. 467-482. In: FREDERICO, M. H. H.; BRENTANI, R. R. **Clínica médica: Doenças Hematológicas, Oncológicas, Renais e Geniturinárias**. Barueri-SP: Manole, 2009. Disponível em: <http://www.ulbra.br/novo-comuns/pages/biblioteca-virtual.html>. Acesso em: 26 março/ 2013.

SAMPAIO, S. C. Principais métodos de coloração de células. In: PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. d.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2007, p. 229-246.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, J. T. W., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**. v.82, p. 1107–12, 1990.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. V. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of ethnopharmacology**. v.94, p. 219–243, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Berlin: Springer, 1996. p. 374.