

## ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE *Prosopis Juliflora* FRENTE A CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA E CÂNCER DE OVÁRIO

Ana Carla Ferreira COSTA<sup>1</sup> & Giani Maria CAVALCANTE<sup>1,2\*</sup>

1 Centro Universitário Maurício de Nassau, Recife, Pernambuco, Brasil.

2 Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

\*Autor para correspondência: gianimc@icloud.com

DOI: <http://dx.doi.org/10.18571/acbm.161>

### RESUMO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e entre os muitos avanços recentes na quimioterapia contra a doença, os produtos naturais oriundos de plantas têm desempenhado um papel importante. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antitumoral de *Prosopis juliflora* contra células tumorais humanas MDA-MB-231 (tumor de mama) e SKOV-3 (tumor de ovário) para buscar novos medicamentos derivados de fontes naturais. Testes *in vitro* foram conduzidos com os extratos brutos de folhas e de casca de caule frente as linhagens de células tumorais MDA-MB-231 e SKOV-3 através do teste de citotoxicidade utilizando MTT (3-(4,5-dimetiazol-2il) 2,5-difenil tetrazólio de brometo) através da monitorização após 24, 48 e 72 h de exposição das células tumorais e não tumorais a diferentes concentrações dos extratos (100; 50; 25; 12,5 µg / mL). Os testes de citotoxicidade também foram realizados contra células não tumorais (fibroblastos). O extrato de casca de caule de *P. juliflora* inibiu a proliferação de células MDA-MB-231 (28,9%) e não inibiu a proliferação de linhas de células SKOV-3. Este extrato apresentou baixa toxicidade frente as células de fibroblasto. Em contraste, o extrato de folhas de *P. juliflora* não foi ativo em nenhuma linhagem celular testada. O estudo químico para extração e isolamento de compostos ativos oriundo do extrato da casca de caule é recomendado para ensaios *in vitro* desses compostos para investigar a atividade antitumoral.

**Palavras-chaves:** Atividade antitumoral; Produtos naturais; *Prosopis juliflora*.

### ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death in the world, among many recent advances in cancer chemotherapy, plant natural products have played an important role. The aim of this study was investigated the antitumor activity of *Prosopis juliflora* against human tumor cells lines MDA-MB-231 (breast tumor) and SKOV-3 (ovarian tumor) to search for new drugs derived from natural sources. In vitro test was conducted with crude extract foliar and stem bark against tumor cells lines MDA-MB-231 and SKOV-3 through in using MTT (3-(4,5-dimethythiazol-2yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide) based cytotoxicity monitoring after 24, 48 and 72 h exposure of the MOLT-4 cells to different concentration of the extract ranging from 100; 50; 25; 12.5 µg/mL. The cytotoxicity assays too were realized against cells fibroblast. The extract of stem bark of *P. juliflora* inhibited the proliferation of cells lines MDA-MB-231(28.9%) and don't inhibited the proliferation of cells lines SKOV-3. This extract presented low toxicity in cells human fibroblast. By contrast the extract of leaves of *P. juliflora* were not active in any tested cells lineage. Chemical study to extraction and isolation of actives compounds of extract of stem bark is recommended to *in vitro* assays these compounds to investigate the antitumor activity.

**Keywords:** Antitumor activity; Natural Products; *Prosopis juliflora*.

## 1 Introdução

O câncer é uma doença genética complexa que constitui um importante problema de saúde pública em todo mundo sendo responsável por cerca de sete milhões de óbito a cada ano, consistindo como a terceira causa *mortis* mais frequente no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Dentre as neoplasias, o câncer de mama é a mais frequente entre as mulheres em todo mundo, no Brasil no ano de 2016 foram registrados em torno de 57.000 novos casos, a cada 100.000 mulheres (MELO et al., 2017). Outra neoplasia muito comum em mulheres é o câncer de ovário, de acordo com os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil até o ano de 2016, foram registrados 6.150 novos casos de câncer de ovário (INCA, 2016).

De acordo com Zhang e colaboradores (2011), os extratos vegetais apresentam um papel importante no desenvolvimento de quimioterápicos anticancerígenos, uma vez que 74% destes compostos advém de produtos naturais ou derivados destes. Deste modo, a descoberta de novas drogas, a partir de produtos derivados de plantas se destacam por ser uma fonte segura e capaz de originar compostos de alta eficiência (VIEIRA et al., 2017). Compostos como diterpeno taxol, extraído da espécie *Taxus brevifolia*, utilizado para o tratamento do câncer pulmonar, é um exemplo de substâncias oriunda de vegetais com eficiência antitumoral (GURIB-FAKIM, 2006).

Dado que, o câncer e as neoplasias, vindo sendo responsáveis por 75% dos óbitos, é de fundamental importância as pesquisas para descoberta de novos compostos antitumorais e sua avaliação em vários sistemas tumorais e cultura de tecido, objetivando obter e selecionar compostos mais efetivos (BRANDÃO et al., 2010). Para isso, a utilização de testes simples e rápidos capazes de avaliar as atividades biológicas de extratos e compostos vegetais, vem sendo utilizados para obtenção de melhores indicações na utilização das plantas, e por isso devem ser aplicados continuamente.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral do extrato hidroalcolólico das folhas e casca de caule da espécie vegetal *Prosopis juliflora* frente a células tumorais das linhagens MDA-MB-231 (tumor de mama) e SKOV-3 (tumor de ovário).

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Material vegetal e obtenção dos extratos

Diferentes partes vegetais de *P. juliflora* foram coletadas, de forma randomizada, em indivíduos arbóreos distribuídos na Praça Centenário, no bairro do Farol, na cidade de Maceió, Alagoas. Após a coleta, as partes vegetais foram acondicionadas em sacos plásticos e levados ao Herbário do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA/AL) para confirmação da espécie por especialistas. Uma exsiccata foi depositada sob o número IMAL-9638.

Para esta pesquisa, as folhas e cascas de caule de *P. juliflora*, foram submetidas à secagem em estufa a 50 °C e deixados no local até a obtenção de um teor-padrão de 20% de umidade. Após a secagem, separadamente, cada parte vegetal foi triturada, com o auxílio de um moinho, e o pó resultante acondicionados em frascos de vidros individuais e identificados.

Para obtenção dos extratos, 100 g do pó de cada parte vegetal, foi separadamente, misturados em solução água: álcool etílico P.A 50% por 72 h, 25 °C, ao abrigo da luz. A mistura foi filtrada e o extrato concentrado em rotaevaporador rotativo sob vácuo a 30 °C. Após a evaporação total do solvente, obteve-se os extratos EF (extrato da folha) e ECC (extrato da casca do caule), estes foram, separadamente, acondicionados em recipientes de vidros devidamente identificados. Quando selecionados para os ensaios de atividade antitumoral, os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido a 0,01% (DMSO 0,01%), uma vez que este não interfere no desenvolvimento celular, conforme afirma Ostrosky et al. (2008).

## 2.2 Cultura de Células

Para os ensaios de proliferação celular foram utilizadas três linhagens de células humanas: MDA-MB-231 (tumor de mama) e SKOV-3 (tumor de ovário), obtidas junto a Sigma-Aldrich®; e FH (fibroblastos), obtidos junto ao banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As manipulações das culturas celulares foram realizadas em câmara de fluxo laminar vertical, de acordo com a metodologia descrita por Lemes et al. (2017).

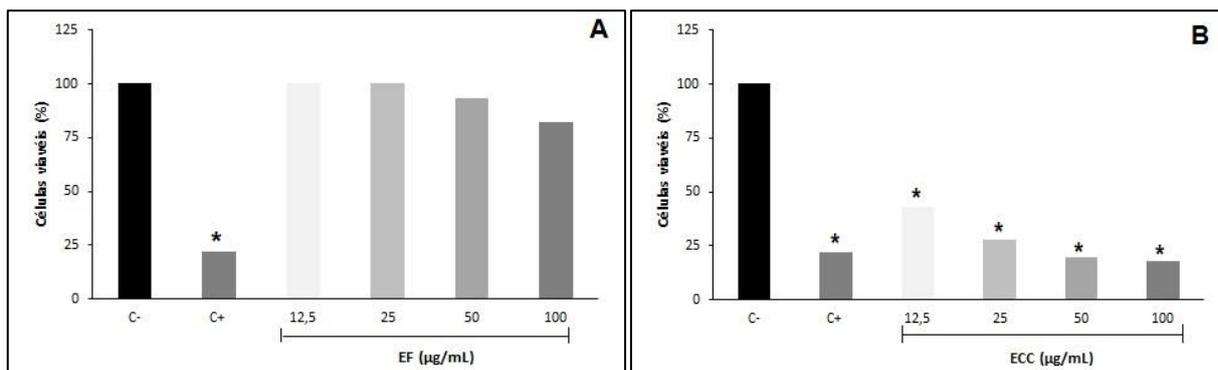
As células tumorais foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando recrutadas para os testes biológicos, as células foram submetidas a tripsinização. Para isso, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com 5 mL de tampão de fosfato-salino (PBS), após esse procedimento, 2 mL de tripsina foram adicionados e submetidas a incubação, por 5 minutos, sob as condições anteriormente descritas. Transcorrido esse período, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 5 mL de DMEM. Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizado o corante de exclusão, azul de tripan, no qual foram adicionados 10 µL do corante e 10 µL de suspensão celular. Em seguida, foi realizada a contagem de células em Câmara de *Neubauer*.

## 2.3 Ensaio de proliferação celular

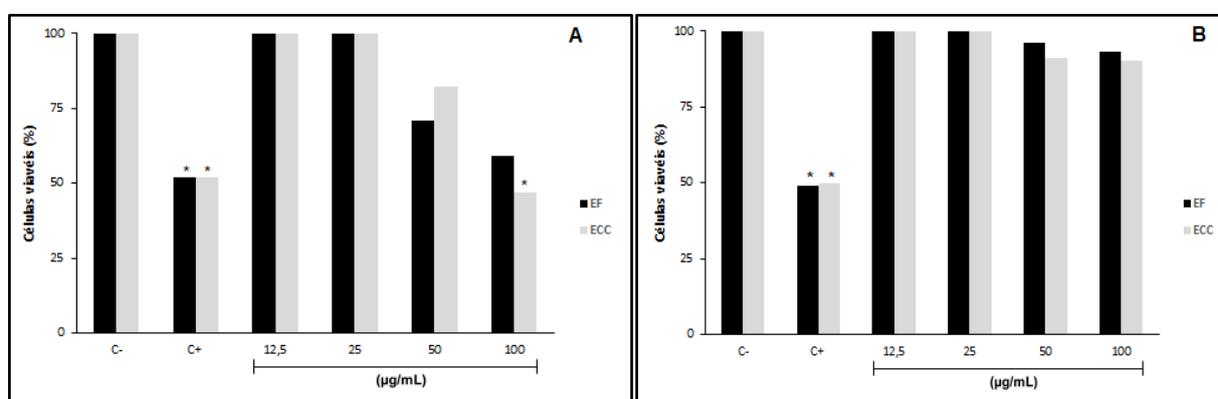
Os efeitos dos EF e ECC de *P. juliflora* sobre a proliferação das células MDA-MB-231, SKOV-3 e FH, foram determinados através do ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazolio] conforme descrito por Mosmann (1983). Em placas de 96 poços, uma concentração celular de  $1 \times 10^4 / 200 \mu\text{L}$ , foram plaqueadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e suplementos adicionais; em seguida, as células foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, transcorrido este período, foram adicionados extratos nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado o fármaco padrão doxorrubicina (1,35 µg/mL) e como controle negativo foram utilizados meio de cultura suplementado com SFB sem células. As células foram incubadas por 72 horas sob as condições descritas anteriormente. Após o tempo de incubação, o sobrenadante de cada poço foi retirado e uma solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada (100 µL/poço). As placas foram mantidas sob ausência de luz durante 4 horas a 37 °C, em seguida, foi adicionado DMSO (100 µL/poço), para diluir os cristais formados. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placa de ELISA a 540 nm. Os valores de proliferação celular foram comparados com os valores dos poços com meio de cultura sem células (Controle negativo) e a análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, utilizando o software BioEstat versão 5.0.

## 3 Resultados e Discussão

Os efeitos do extrato da folha (EF) e do extrato da casca de caule (ECC) de *P. juliflora* na proliferação e viabilidade de células humanas não tumorais (Fibroblastos) são apresentados na Figura 1; enquanto os efeitos destes extratos sobre as células tumorais de mama (MDA-MB-231), de ovário (SKOV-3) são apresentados na Figura 2.



**Figura 1:** (A) Efeitos de diferentes concentrações do extrato da folha (EF) e (B) do extrato da casca de caule (ECC) de *P. juliflora* na proliferação de células não tumorais (Fibroblastos). O controle negativo (C-) corresponde às células tratadas apenas com meio de cultura com SBF e o controle positivo (C+) corresponde às células tratadas com o fármaco padrão, doxorrubicina.



**Figura 2:** (A) Efeitos de diferentes concentrações do extrato da folha (EF) e do extrato da casca de caule (ECC) de *P. juliflora* na proliferação celular de células tumorais de mama MDA-MB-231. (B) Efeitos de diferentes concentrações do extrato da folha (EF) e do extrato da casca de caule (ECC) de *P. juliflora* na proliferação de células tumorais de ovário (SKOV-3). O controle negativo (C-) corresponde às células tratadas apenas com meio de cultura com SBF e o controle positivo (C+) corresponde às células tratadas com o fármaco padrão, doxorrubicina.

De acordo com os resultados o extrato EF não afeta a viabilidade das células não tumorais, em contrapartida, o extrato ECC afetou significativamente a viabilidade destas células, apresentando-se tóxico em todas as concentrações testadas. Quando testados sobre as células tumorais, os extratos EF e ECC apresentaram atividades distintas. O extrato ECC inibiu a proliferação celular da linhagem celular MDA-MB-231 em 28,3 % na maior concentração testada (100 µg/mL). Enquanto o EF não se mostrou promissor para atividade antitumoral, uma vez que o extrato não exibiu nenhuma atividade frente as células tumorais testadas.

Segundo Casanova e Costa (2017), nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Particularmente, em relação a atividade antitumoral de produtos naturais, Viera et al. (2017), relatou a atividade citotóxica dos extratos de *Croton urucurana* frente células leucêmicas humanas U937 e THP1; enquanto, Konan et al. (2012), relataram a citotoxicidade de flavonoides naturais frente a linhagens de células relacionadas a tumores agressivos.

Quimicamente, a espécie *P. juliflora* é rica em polissacarídeos, alcaloides, flavonoides e derivados fenólicos (IBRAHIN et al., 2013; RICÓN et al., 2014; PREETI et al., 2017); e suas atividades biológicas apresentam amplo espectro, sendo confirmadas atividades antimicrobiana (RAJA et al., 2012), atividade antioxidante (ABARCA et al., 2007), atividade antiprotozoária

(RAVIKUMAR et al., 2012) e atividade antitumoral de alcaloides isolados de folhas de *P. juliflora* frente a linhagens de células T de leucemia (Molt-4), através do ensaio de MTT (SATHIYA e MUTHUCHELIAN, 2011).

Nesta pesquisa, apenas o extrato de casca de caule de *P. juliflora* inibiu a proliferação de células tumorais, sendo 28,3% da população de células MDA-MB-231 inibidas de crescer quando submetidas a concentração de 100 µg/mL de ECC. Apesar do baixo percentual de inibição da proliferação, o resultado obtido foi significativo quando comparado com o resultado do fármaco padrão, doxorrubicina. Embora, o ECC tenha sido tóxico para células não tumorais, em todas as concentrações testadas, é importante realizar testes de atividades antitumoral com substâncias isoladas deste extrato, uma vez que de acordo com Gurib-Fakin (2006), em geral, compostos isolados, apresentam resultados diferentes quando presentes em misturas com outros compostos, como é o caso dos extratos vegetais.

No que concerne, a inibição de células tumorais das linhagens MDA-MB-231 e SKOV-3, Lemes e colaboradores (2017), observaram que óleos essenciais obtidos dos frutos de *Kielmeyera coriacea* inibiram em 38% a proliferação de células da linhagem MDA-MB-231; enquanto Jo et al. (2012), observaram que melitina, veneno extraído de abelhas, inibiu significativamente a proliferação de células cancerosas ovarianas da linhagem SKOV-3. Em uma comparação de resultados, os obtidos neste trabalho, estão condizentes com os encontrados na literatura, o que potencializa o extrato da folha de *P. juliflora* como promissor recurso para obtenção de substâncias isoladas a serem testadas em ensaios de atividade antitumoral.

A prospecção de novos compostos com atividade antitumoral a partir de extratos vegetais, é uma realidade e permitirá uma perspectiva de inovação tecnológica para produção farmacêutica de novas moléculas antitumorais.

#### 4 Conclusão

O extrato da casca de caule de *P. juliflora* inibiu a proliferação celular da linhagem tumoral MDA-MB-231 (28,3%), embora o extrato, tenha apresentado toxicidade frente a células não tumorais (fibroblastos), sugere-se estudos de atividade antitumoral de compostos isolados a partir deste extrato. Este mesmo extrato não afetou a proliferação de células tumorais da linhagem SKOV-3.

O extrato da folha de *P. juliflora* não apresentou efeito inibitório sobre a proliferação de nenhuma das células testadas (tumorais e não tumorais).

O resultado obtido junto as células MDA-MB-231, potencializa o extrato da casca de caule de *P. juliflora*, para ser submetido a um estudo químico objetivando extração e isolamento de compostos ativos a serem utilizados em ensaios de atividade antitumoral e toxicidade frente a células não tumorais.

#### 5 Referências

ABARCA, A. N.; CAMPOS, M. G.; ÁVILA-REYS, J. A.; NARANJO-JIMÉNEZ, N.; CORRAL, J. H.; GONZÁLEZ-VALDEZ, L. S. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee from *Prosopis juliflora* (Leguminosae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.2, p.119-124, 2007.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, A. P.; DAVID, J. Química e farmacologia de quimioterápicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO A SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. CONTROLE DOS CÂNCERES DO COLO DO ÚTERO E DA MAMA. (Cadernos de Atenção Básica n.13) (Série A. Normas e Manuais técnicos). Disponível em [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicações/controle\\_canceres\\_colo\\_uterio\\_2013.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicações/controle_canceres_colo_uterio_2013.pdf). Acesso em 04 de fevereiro de 2018.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.2, p.12-17, 2017.

GURIB-FAKIN, A. Review medicinal plants: traditional of yesterday and dugs tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, V.27, N.1, P.1-93.

IBRAHIM, M.; NADIR, M.; ALI, A. Phytochemical analyses of *Prosopis juliflora* Swartz D.C. **Pakistan Journal of Botany**, v.45, n.2, p.20101-2104, 2013.

JO, M.; PARK, M. H.; KOLLIPARA, P. S.; AN, B. J.; SONG, H. S.; HAN, S. B.; KIM, J. H.; SONG, M. J.; HONG, J.T. Anti-cancer effects of bee venom toxin and melithin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n,1, p.72-81, 2012.

KONAN, N. A.; LIPUCOPAN, N.; DIAZ, I. E. C.; JACYSYN, J. F.; TIBA, M.; MENDES, J. G. P.; BACCHI, E. M.; SPIRA, B. Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cells lines. **Experimental and Toxicology Pathology**, v.65, n.5, p.435-440, 2012.

LEMES, R. S.; COSTA, G. C. S.; SILVA, D. C. S.; BECCENERI, A. B.; BICALHO, K. U.; MIRANDA, M. L. D.; DINIZ, V. S. S.; CAZAL, C. M. Óleos essenciais dos frutos e folhas de *Kielmeyera coriacea*: atividade antitumoral e estudo químico. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.3, p.1245-1257, 2017.

MELO, F. B. B.; VILANOVA, C. A. M.; SILVA, A. R.; NÍGLIO, E. F.; RIVERO, M. G. G. Ações do enfermeiro na detecção precoce do câncer de mama. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.70, n.6, p.1183-1192, 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.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANECO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PRETTI, K.; SHARMA, R. A.; ACARWAL, M. Isolation and identification of flavonoids from *Prosopis juliflora*. **Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences**. V, 6, n.1, p.1-3, 2017.

RAJA, K.; SARAVANAKUMAR, A.; VIJAYAKUMAR, K. Efficient synthesis of silver nanoparticules from *Prosopis juliflora* leaf extract and its antimicrobial activity using senace spectrochim. **Acta Molecular Biomolecular Spectroscopy**, v. 97, n.1, p.491-494, 2012.

RAVIKUMAR, S.; INBANESON, S. J.; SUGANHI, P. *In vitro* antiplasmodial activity of ethanolic extracts of south Indian medicinal plants against *Plasmodium falciparium*. **Asian Journal Tropical Diseases**, v.2, n.1, p.180-183, 2012.

RICÓN, F.; MUÑOZ, J.; RAMIREZ, P. Physicochemical and rheological characterization of *Prosopis juliflora* seed gum aqueous dispersions. **Food Hydrocoll**, v. 35, n.1, p.357-357, 2014.

SATHIYA, M.; MUTHUCELIAN, R. Antitumor potential of total alkaloid extract of *Prosopis juliflora* of leaves against MOLT-4 cells *in vitro*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n2, p.8881-8888, 2011.

VIEIRA, G. T.; OLIVEIRA, T. T.; MONTEIRO, L. P.; KANASHIRO, M. M.; COSTA, M.R.; PEREIRA, W. L. Avaliação citotóxica do extrato de *Croton urucurana* Baill contra linhagens de células leucêmicas humanas U937 e THP1. **Ciência e Natura**, v.39, n.3, p. 512-519, 2017.

ZHANG, Z.; TERUYA, K.; ETO, H.; SHIRAHATA, S. Extract induces apoptosis in MCF-7 cells via mechanism involving the ROS-dependent JNK activation and mitochondria mediated pathways. **PlosOne**, v.11, n.6, p.e27441.