



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO

CAMPUS CARAÚBAS

CURSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

FRANCISCO FERNANDES DA COSTA FILHO

**ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DOS EXTRATOS HEXÂNICO E
ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *ARTEMISIA ABSINTHIUM***

CARAÚBAS

2016

FRANCISCO FERNANDES DA COSTA FILHO

**ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DOS EXTRATOS HEXÂNICO E
ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *ARTEMISIA ABSINTHIUM***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Coordenação do Curso Bacharelado em Ciência e Tecnologia da UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, como requisito parcial da obtenção da graduação no referido curso. Este trabalho foi realizado sob a orientação do Profº Drº Cláudio Costa dos Santos do Centro de Ciências Sociais, Aplicadas e Humanas da UFERSA.

CARAÚBAS

2016

FRANCISCO FERNANDES DA COSTA FILHO

**ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* DOS EXTRATO HEXÂNICOS E
ETANÓLICO DAS FOLHAS DA *ARTEMISIA ABSINTHIUM***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Coordenação do Curso Bacharelado em Ciência e Tecnologia da UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, como requisito parcial da obtenção da graduação no referido curso. Este trabalho foi realizado sob a orientação do Profº Drº Cláudio Costa dos Santos do Centro de Ciências Sociais, Aplicadas e Humanas da UFERSA.

Defendida em: 17 / 11 / 2016.

BANCA EXAMINADORA

[Redacted Signature]

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Costa dos Santos (UFERSA)

[Redacted Signature]

1. Examinador: Prof. Dr. Luiz Ferreira da Silva Filho (UFERSA)

[Redacted Signature]

2. Examinador: Profa. Dra. Roberta Pereira da Silva (UFERSA)

CARAÚBAS

2016.

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

C
837a Costa Filho, Francisco Fernandes da.
Atividade citotóxica in vitro dos extratos
hexânico e etanólico das folhas da artemisia
absinthium. / Francisco Fernandes da Costa Filho.
- 2016.
27 f. : il.

Orientador: Cláudio Costa dos Santos.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Ciência e
Tecnologia, 2016.

1. Atividade citotóxica. 2. Artemisia
absinthium. 3. Teste MTT. 4. Extratos vegetais.
I. Santos, Cláudio Costa dos, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a de DEUS por ter ajudado a enfrentar todos o problema que apareceu no caminho até aqui e os caminhos que ainda há por vim.

A minha mãe, Maria do Socorro, que desde pequeno lutou para me dá a melhor educação, incentivar a construção de uma vida acadêmica. Por todos os momentos que liguei para desabafar diante de tudo que vinha passando e sabia usar as palavras certas para me acalmar, ao chegar em casa sempre tinha seu abraço, amor e carinho para me fazer ver o que o real motivo por estar onde estou...

A minha irmã, Fernanda Sabrina por todos os conselhos, carinho e amor que me deu nesse período de faculdade.

A minha namorada, Stephanie Oliveira, que com seu enorme amor, carinho e dedicação esteve ao meu lado me ajudando a crescer a cada dia, me motivando nos momentos de baixo ânimo e aguentando todos os meus estresses. Só tenho agradece-la por todo momento ao meu lado.

Ao Professor Dr. Claudio Costa dos Santos, meu orientador, por toda paciência de receber minhas cobranças sobre o andamento das análise da UFC, pelas cobranças, apoio e conselhos.

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, coordenador do laboratório de oncologia experimental (LOE-UFC) e a Gabriel Gusmão pelas análises de atividade citotóxicas *in vitro*.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado auxiliando nos estudos, na diversão e mantendo a calma nos momentos de estresse.

A UFERSA por todo conhecimento construído nesta vida acadêmica, mudando a minha visão diante do mundo, da sociedade e também na construção de novas amizades.

A todos os meus professores, pela dedicação, paciência ensinou o verdadeiro valor do conhecimento e aprendizado, fazendo eu crescer a cada dia.

A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein).

COSTA FILHO, Francisco Fernandes da. **Atividade citotóxica *in vitro* dos extratos hexânico e etanólico das folhas da *artemisia absinthium***. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró. 2016.

RESUMO

A *Artemisia absinthium* é uma espécie nativa das regiões temperadas da Eurásia e do norte da África com história na medicina popular. As folhas e brotos de floração são utilizados na medicina popular como anti-helmíntico, anti-inflamatório, antisséptico, antiespasmódico, antitumoral, tônico estomacal, vermífugo, anti-hipertensivo e antipirético. Os estudos realizados até hoje sobre a atividade anticancerígena da *A. absinthium* mostram potencialidades do extrato metanólico das partes aéreas no combate ao câncer de mama, surgindo assim o interesse para avaliar potencialidade da mesma no combate de outros tipos de câncer. Uma amostra da planta coletada no estado Pará nos foi enviada para realização do estudo citotóxico *in vitro*. Foram preparados extratos das folhas *A. absinthium* utilizando hexano (AAFH) e etanol (AAFE). A atividade citotóxica *in vitro* foi realizada com o teste MTT que comprovou a eficácia para linhagens de células tumorais humanas HTC116 (colón), SF295 (sistema nervoso central) e PC-3 (próstata). A investigação fitoquímica e posterior tratamento cromatográfico para isolamento e purificação dos metabólitos secundários responsáveis pela atividade citotóxica foi iniciado com o extrato hexânico.

Palavras-chave: Atividade citotóxica; *Artemisia absinthium*; Teste MTT; Extratos vegetais

COSTA FILHO, Francisco Fernandes da. **Atividade citotóxica *in vitro* dos extratos hexânico e etanólico das folhas da *artemisia absinthium***. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró. 2016.

ABSTRACT

Artemisia absinthium is a species native to the temperate regions of Eurasia and North Africa with a history of folk medicine. Flowering leaves and buds are used in folk medicine as anthelmintic, anti-inflammatory, antiseptic, antispasmodic, antitumor, stomach tonic, vermifuge, antihypertensive and antipyretic. The studies carried out to date on the anticancer activity of *A. absinthium* show potential of the methanolic extract of the aerial parts in the fight against breast cancer, appearing the interest to evaluate its potential in the fight against other types of cancer. A sample of the plant collected in the state of Pará was sent to us for the *in vitro* cytotoxic study. Extracts from *A. absinthium* leaves were prepared using hexane (AAFH) and ethanol (AAFE). *In vitro* cytotoxic activity was performed with the MTT test that proved the efficacy for human tumor cell lines HTC116 (colon), SF295 (central nervous system) and PC-3 (prostate). The phytochemical investigation and subsequent chromatographic treatment for isolation and purification of the secondary metabolites responsible for the cytotoxic activity was initiated with the hexane extract.

Key-words: Cytotoxic activity; *Artemisia absinthium*; MTT test; Plant extracts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Artemisia absinthium</i>	15
Figura 2	<i>Artemisia absinthium</i> coletada no Pará.....	19
Figura 3	Extrato hexânico da AA.....	20
Figura 4	Extrato etanólico da AA.....	20
Figura 5	Processo de isolamento do material precipitado insolúvel em hexano em AAFH. (a) AAFH; (b) AAFH-PPT; (c) Ensaio comparativo em CCD de AAFH e do AAFH-PPT.....	22
Figura 6	Extração dos compostos orgânicos isolados a partir da CCD.....	22

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Incidência dos principais tipos de câncer, segundo sexo.	17
Gráfico 2	Avaliações da citotoxicidade in vitro em dose única, através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 3 linhagens de células tumorais.....	23
Gráfico 3	Comparativos de inibição entre os extratos AAFH e AAFE.....	24

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. GERAIS:.....	13
2.2. ESPECÍFICOS:.....	13
3. JUSTIFICATIVA.....	14
4. REFERENCIAL TEÓRICO	15
4.1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA.....	15
4.2. CÂNCER	16
4.3. EXTRAÇÃO DE MATERIA ORGÂNICA.....	17
4.4. CITOTOXICIDADE.....	17
4.5. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	18
5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	19
5.1. COLETA DO MATERIAL E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTAS	19
5.2. EXTRAÇÃO DAS FOLHAS.....	19
5.3. TESTE DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	20
5.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
8. REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

O câncer atinge uma grande parcela da população. É caracterizado pelo crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. Os tratamentos de combate ao câncer são as radioterapias, quimioterapias, cirurgias e a fitoterapia, que cada vez mais vem sendo empregada no combate ao câncer e tomado grandes proporções no mundo científico (INCA, 2016).

Fitoterapia é o tratamento de doenças que utiliza plantas. A maioria dos medicamentos populares não possuem comprovação científica e nem são testados devidamente como é determinado pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA.

A *Artemisia absinthium* é uma espécie nativa das regiões temperadas da Eurásia e do norte da África com história na medicina popular. As folhas e brotos de floração são utilizados na medicina popular como anti-helmíntico, anti-inflamatório, antisséptico, antiespasmódico, antitumoral, tônico estomacal, vermífugo, anti-hipertensivo e antipirético. Suas substâncias ativas incluem absintina, anabsintina, tujona, tânico e substâncias resinosas, ácido málico e ácido succínico (SAXENA *et al*, 2012). Extratos obtidos a partir de plantas não são altamente eficazes e requerem modificação química para melhorar a potência e perfil de toxicidade (SAFHI *et al*, 2012). Os estudos feitos até hoje sobre a atividade da *A. absinthium* mostram potencialidades das partes aéreas no combate ao câncer por meio de apoptose, mas sem destacar as substâncias responsáveis.

Vários estudos sobre plantas medicinais vêm sendo levantado para verificar a ocorrência de atividades anticancerígenas. Os fitoquímicos que têm sido utilizados na quimioterapia contra o câncer, foram originalmente derivados a partir de ervas e plantas, tais como o paclitaxel (RAZIS; FOUNTZILAS, 2001), etoposido (HAINSWORTH; GRECO, 1995), camptotecina (GARCIA-CARBONERO; SUPKO, 2002) e alcalóides vinca (JORDAN *et al*, 1991). O extrato metanólico das partes aéreas da *A. absinthium* revelou a presença de taninos e flavonóides (como eupafolina, diosmetina, ramnetina, apigenina e seus glicosídeos, luteolina, quercetina, rutina e vitexina) que se caracterizam por suas propriedades anticancerígenas (NAWAB *et al*, 2011; BLAGOJEVIC *et al*, 2006). Teste das atividades citotóxicas do extrato metanólico das partes aéreas da espécie *Artemisia absinthium* mostra

potencialidade de desencadeamento da morte celular (apoptose) na linhagem de células MCF7 (câncer de mama) (GORDANIAN *et al*, 2014; SHAFI *et al*, 2012).

Os extratos brutos das partes aéreas da *A. absinthium* inibem a proliferação celular através da morte celular. Embora muitos agentes anticancerígenos tenham sido desenvolvidos, os efeitos secundários desfavoráveis são problemas graves. Assim, há interesse crescente na utilização de plantas para o tratamento de cânceres e desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes e seguros (SAFHI *et al*, 2012).

Para o presente estudo, foram analisados os extratos hexânico e etanólico da *A. absinthium* para identificar a potencialidade no combate de células cancerígenas, com base nos estudos realizados até o presente momento, que se mostra promissora para extratos metanólicos das partes aéreas da *A. absinthium* no combate as células MCF-7 (câncer de mama). Os testes anticancerígenos foram realizados para as células HTC116 (colón), em SF295 (sistema nervoso central) e PC-3 (próstata).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS:

Produzir extratos a partir das folhas da *Artemisia absinthium* e avaliar a atividade citotóxica *in vitro*.

2.2. ESPECÍFICOS:

- Produzir extratos hexânico e etanólico das folhas da *Artemisia absinthium*
- Testar atividade citotóxica *in vitro* para as linhagens de células tumorais humanas HTC116 (colón), em SF295 (sistema nervoso central) e PC-3 (próstata).
- Isolar compostos das folhas da *Artemisia absinthium* utilizando solventes orgânicos de diferentes polaridades desde o hexano até o etanol e purificar com cromatografia.
- Caracterizar as estruturas químicas por espectrometria.

3. JUSTIFICATIVA

O uso da medicina popular é um conhecimento empírico usado desde os primórdios da humanidade e cada vez mais vem sendo estudado para comprovar cientificamente as suas atividades químicas e biológicas. Os estudos feitos até hoje sobre a atividade da *A. absinthium* mostram potencialidades do extrato metanólico das partes aéreas no combate ao câncer por meio de apoptose contra MCF7 (câncer de mama).

A identificação de constituintes químicos oriundos de plantas que combatem o câncer e/ou outras mazelas seria uma grande contribuição para a ciência, aumentando as possibilidades de tratamento contra o câncer e as chances de cura, melhorando a qualidade de vida da população.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA

Artemisia absinthium (Figura 1) é conhecida como absinto, um aromático, herbáceo, uma planta perene com um rizoma lenhoso duro. É amargo, aromático, utilizada para estimular o apetite, para doenças gastrintestinais e comumente utilizado na indústria alimentar para a preparação de aperitivos (JOSHI, 2013). Este gênero é encontrado principalmente no hemisfério Norte e diminui no hemisfério sul. O gênero *Artemisia* pertence à tribo Anthemideae da família Asteraceae. Existem cerca de 500 espécies de ervas e arbustos neste gênero. Sua espécie é encontrada principalmente na Ásia, Europa e América do Norte (GORDANIAN *et al*, 2014).

Figura 1- *Artemisia absinthium*



Fonte: <http://www.shutterstock.com/pt/pic-157414685/stock-photo-absinthium-artemisia-absinthium.html?src=odmbMk85dfcQrYq-bpH7Fg-1-1>

É uma planta medicinal, apresentando diversas propriedades farmacológicas, tais como anti-helmíntico, antipirético, anticancerígena (CHEMESOVA *et al*, 1987), anti-inflamatório, antidepressivos, antimicrobiana, antioxidante, cognitiva, o potencial de antiprotozoário, intoxicante, neurotóxico, entre outras (JOSHI, 2013). Também é utilizado para efeitos antiparasitários e no tratamento de anorexia e indigestão. Suas partes aéreas estão presentes em muitas preparações à base de plantas gástricas, em suplementos alimentares e nas bebidas alcoólicas (ABERHAM *et al*, 2010).

O amargo característico da absinto é causado por lactonas sesquiterpênicas, anabsim, δ -cetopelenolideo e anabsintim. Além disso, as lactonas sesquiterpênicas, lignanas polifenóis e flavonóides estão presentes também em extratos da *A. absinthium* (ABERHAM *et al*, 2010); (GONZALEZ-COLOMA *et al*, 2012).

4.2. CÂNCER

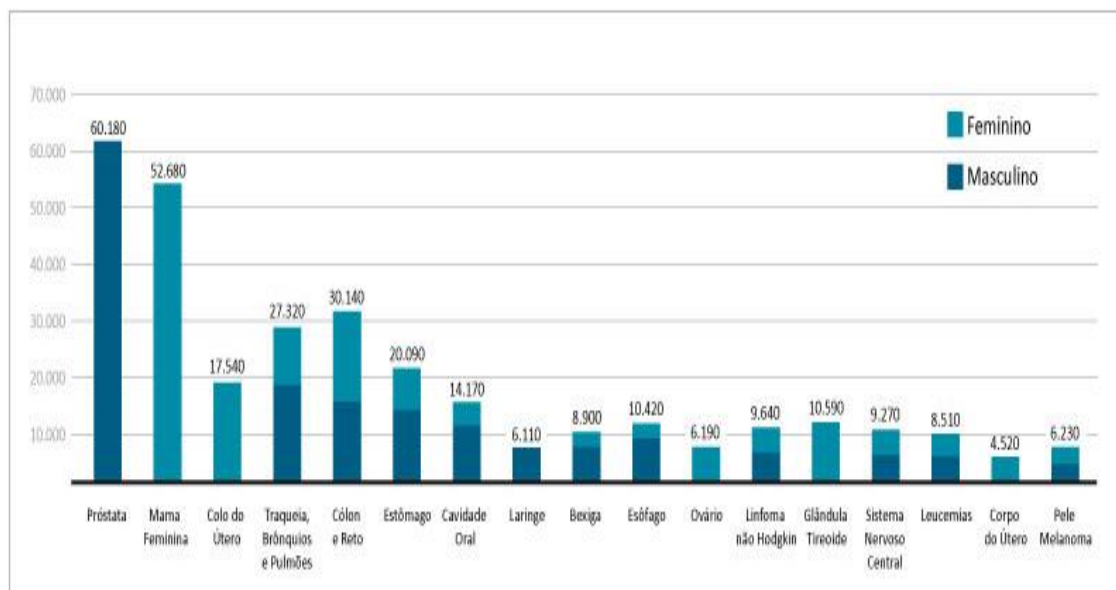
Segundo o Instituto Nacional de Câncer (2014) o câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, caracterizado por ser uma doença crônica degenerativa que acomete milhões de pessoas sem designar faixa etária, sexo, condições socioeconômica ou cultural e está entre as principais causas de morte em todo o mundo (INCA, 2014).

As células normais que formam os tecidos do corpo humano são capazes de se multiplicar por meio de um processo contínuo que é natural, portanto, a proliferação celular não implica necessariamente a presença de malignidade, podendo simplesmente responder as necessidades específicas do corpo (BRASIL, 2011).

Todas as estruturas orgânicas apresentam um parênquima, representado pelas células em atividade metabólica ou em duplicação, e um estroma, representado pelo tecido conjuntivo vascularizado, que tem a finalidade de dar sustentação e nutrição ao parênquima. Os tumores também possuem estas estruturas, sendo que os benignos, por exibirem crescimento lento, possuem estroma e uma rede vascular adequada, por isso que raramente apresentam necrose e hemorragia. Já os tumores malignos, que são caracterizados pela rapidez e desorganização do crescimento, pela capacidade infiltrativa e pelo alto índice de duplicação celular, apresentam uma desproporção entre o parênquima tumoral e o estroma vascularizado (BRASIL, 2013).

Os principais tipos de câncer que mais acomete a população brasileira são: O câncer de próstata, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cólon e reto, câncer de estômago e câncer de colo uterino, câncer da cavidade oral, câncer de esôfago, leucemias, câncer de pele não melanoma e câncer de pele do tipo melanoma, como observa-se na tabela a seguir.

Gráfico 1 - Incidência dos principais tipos de câncer, segundo sexo.



Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA, 2011.

4.3. EXTRAÇÃO DE MATERIA ORGÂNICA

Para a separação de compostos de um extrato vegetal é necessário à utilização de um solvente, ou mistura de solventes, que tenha afinidade com o material que originará no arraste das substâncias que apresentem afinidade com os solventes orgânicos.

A escolha do solvente para produção do extrato de plantas é feita baseado nos objetivos do estudo. Para extrair misturas de compostos de baixas polaridades utilizam-se solventes pouco polares (como éter de petróleo, hexano, clorofórmio) e poucos hidrófilos. Já etanol e metanol extraem compostos mais polares e hidrófilos (MATOS, 1970).

4.4. CITOTOXICIDADE

Para determinar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos a ISO 10993 do Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), indica a utilização do ensaio de citotoxicidade *in vitro* e depois de comprovada a não toxicidade é que se pode dá continuidade e iniciar os ensaios *in vivo* em cobaias (animais de laboratório).

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO *et al*, 2000). O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular por colorimetria, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio – MTT que baseia-se na capacidade da enzima succinato desidrogenase, ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio, que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são de cor púrpura (BARRETO, 2013). Portanto, é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI *et al*, 1996).

As vantagens dos métodos *in vitro* em relação aos *in vivo* são as eliminações do número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente em um período mais curto na maioria dos casos. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente em uso nas clínicas (ROGERO *et al*, 2003).

4.5. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária.

Cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel é uma das técnicas mais utilizadas para a separação e identificação de produtos naturais, sendo amplamente empregada para o controle de qualidade analítico de matérias-primas vegetais e fitoterápicos (CÉSAR, *et al* 2007). A CCD é uma técnica largamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação. Consiste na separação dos componentes através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (LOPES, 2006).

5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.1. COLETA DO MATERIAL E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTAS

O material foi coletado em dezembro de 2015 no estado do Pará e enviado aos cuidados do Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho tendo como indicação se tratar da *Artemisia absinthium*. O material vegetal foi encaminhado ao Herbário Prisco Bezerra EAC-UFC para identificação botânica e caracterizada como pertencente à família Asteraceae.

Figura 2 - *Artemisia absinthium* coletada no Pará



Fonte: Autor

5.2. EXTRAÇÃO DAS FOLHAS

As folhas da *Artemisia absinthium* foram secas e trituradas ($m = 84g$) e extraídas a frio exaustivamente em percolador com hexano (AAFH) seguido de etanol (AAFE).

Após a extração o AAFH e o AAFE foram concentrados por rotaevaporação IKA com pressão reduzida e calor.

Após a extração o material foi concentrado e o extrato seco AAFH (figura 03), rendeu $m = 10,7838g$. O aspecto físico de AAFH assemelha-se a uma cera oleosa de cor amarelo amarronzada, característica não rara de extratos apolares.

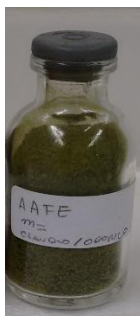
Figura 3 - Extrato hexânico da AA



Fonte: autor

A mesma metodologia foi seguida para o extrato seco AAFE (figura 04) que rendeu $m = 6,7446g$. O aspecto de AAFE é um pó verde.

Figura 4 - Extrato etanólico da AA



Fonte: autor

5.3. TESTE DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

As células em suspensão ou em monocamadas foram plaqueadas em placas de multicavidades de 96 poços. A densidade das linhagens no plaqueamento encontra-se descrito na tabela 1. Após 24 horas de incubação, 100 μL das substâncias testes foram incubadas com a suspensão de células. Após 69 horas de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 minutos) e o sobrenadante, descartado. Cada poço, recebeu 150 μL da solução de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio - MTT a 0,5 mg/mL, tendo sido incubadas por 3 horas, em estufa incubadora com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspensionado em 150 μl de DMSO. Para quantificação do formazan obtido pela redução do MTT nas células viáveis, as absorbâncias foram lidas com

auxílio de espectrofotômetro de placa empregando o software Multimode Detection, onde o comprimento de onda foi ajustado para 595 nm. A doxorubicina e/ou rotenona foram utilizadas como controle positivo dos experimentos (MOSMANN *et al.*, 1983).

Tabela 1 - Linhagens tumorais usadas nos ensaios in vitro de citotoxicidade.

Linhagem	Tipo histológico da linhagem (Origem)	Concentração de plaqueamento (Células/ml)
HCT-116	Carcinoma colo retal	7×10^4
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	1×10^5
SF-295	Glioblastoma	1×10^5

Fonte: Autor

5.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A cromatografia em camada delgada foi efetuada em cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Aldrich) com espessura de 0,20 mm contendo indicador de fluorescência.

A visualização das manchas em placas analíticas de sílica foram realizadas pela exposição destas à radiação de luz ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda 312 e 365 nm, pela utilização de lâmpada modelo CN-15 LM VILBER LOURMAT e/ ou pela pulverização com uma solução de vanilina e ácido perclórico 10% em etanol, seguido de aquecimento em estufa. Os solventes utilizados para cromatografia foram: hexano e acetato de etila.

Foram realizados testes com cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos hexânico e etanólico. A dissolução de AAFH com hexano apresentou um precipitado sólido insolúvel. Teste de solubilidade positivo do material precipitado com acetato de etila, solvente orgânico de polaridade mais alta, demonstrou que o mesmo tratava-se de composto orgânico. Foi então realizado um teste comparativo do extrato bruto AAFH com o material precipitado. O resultado está representado na figura 5 (pág 24)

O material insolúvel foi recristalizado e submetido à técnica de cromatografia em camada delgada preparativa visando à purificação do composto orgânico de coloração amarela.

Foram aplicados aproximadamente 40 mg do material por placa, num total de 4 placas. A corrida cromatográfica foi eluída com a mistura de solventes hexano: acetato de etila na proporção 2:1. O material resultante da separação foi raspado e os compostos orgânicos extraídos com acetato de etila (Fig. 6, pág. 24)

Figura 5 - Processo de isolamento do material precipitado insolúvel em hexano em AAFH. (a) AAFH; (b) AAFH-PPT; (c) Ensaio comparativo em CCD de AAFH e do AAFH-PPT.



Fonte: Autor

Figura 6 - Extração dos compostos orgânicos isolados a partir da CCD

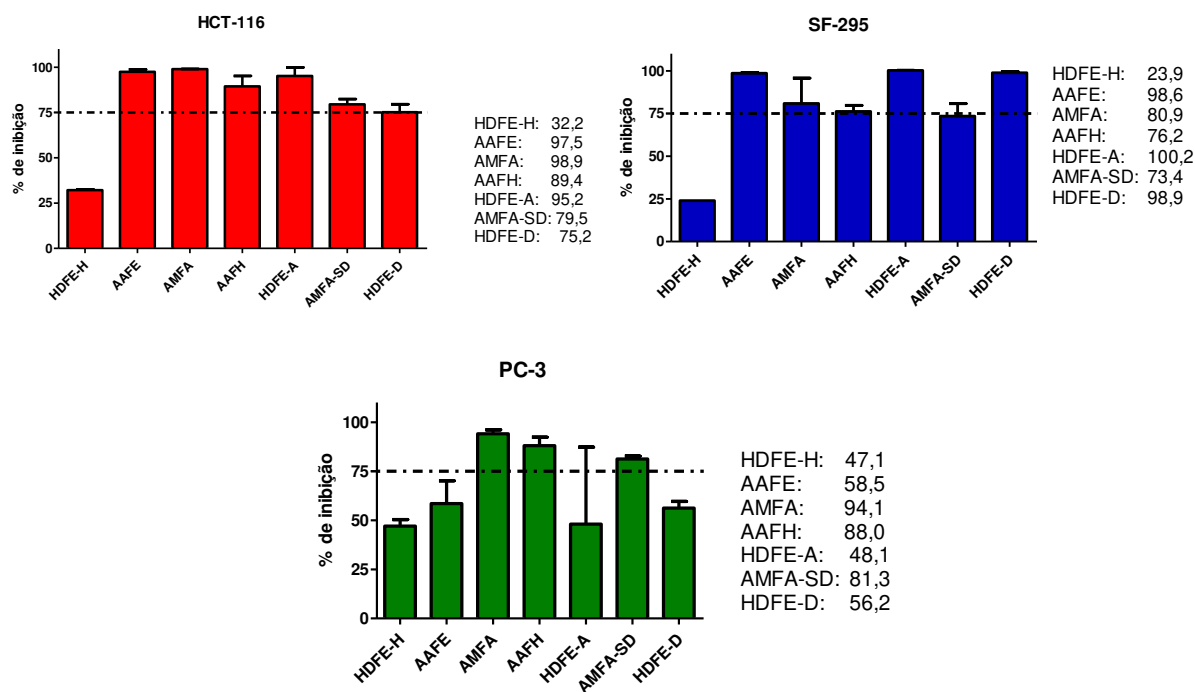


Fonte: Autor

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos obtidos das folhas da *A. absinthium*, AAFH e AAFE, foram testados no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE-UFC) por meio do ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT, em concentração única 25 microgramas/mL de extrato. Os resultados encontram-se descritos no gráfico 2, mostrando a porcentagem de inibição das células cancerígenas para diversos extratos de várias plantas.

Gráfico 2 - Avaliações da citotoxicidade *in vitro* em dose única, através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 3 linhagens de células tumorais

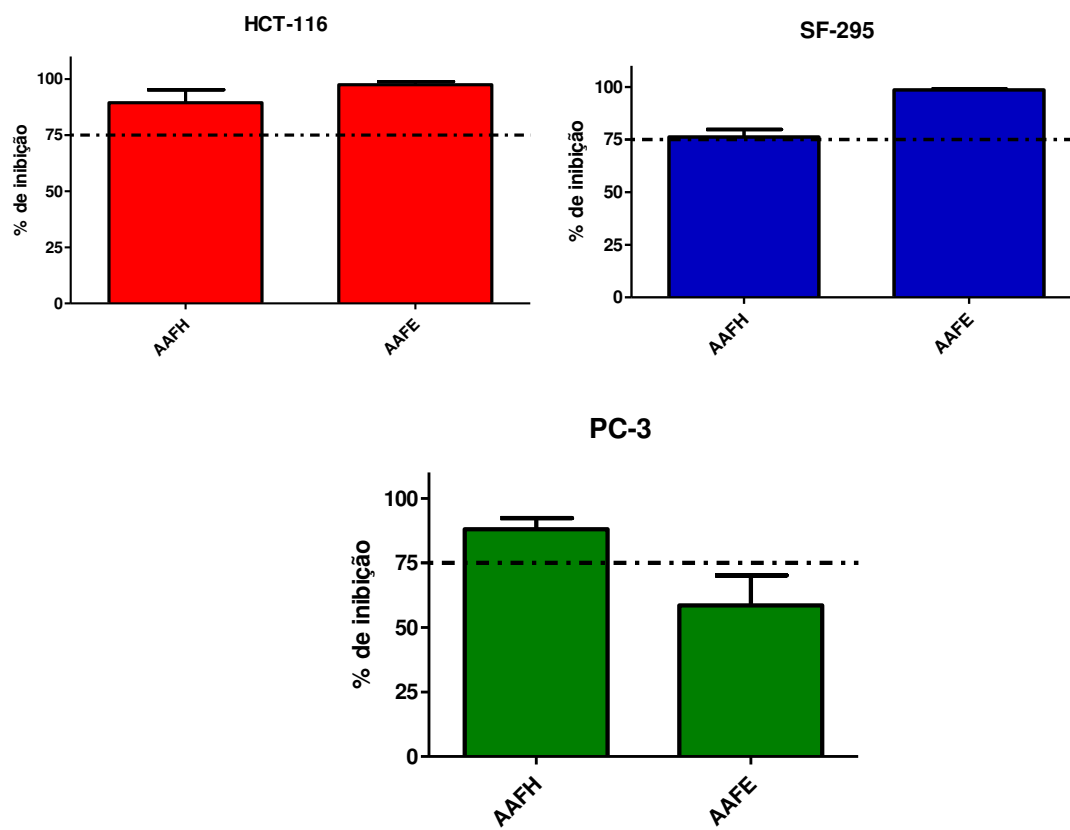


Fonte: Autor

O extrato AAFE mostra uma porcentagem de inibição acima de 75% nas células HCT-116 e SF-295, 97,5% e 98,6%, respectivamente. Enquanto nas células PC-3 obteve somente 58,5% de inibição.

Já AAFH obteve 89,4% de inibição nas células HCT-116, 76,2% em SF-295 e 88,0% em células PC-3. A figura mostra um comparativo entre os extratos AAFH e AAFE para cada linha celular testada.

Gráfico 3 - Comparativos de inibição entre os extratos AAFH e AAFE



Fonte: Autor

A AAFH manteve inibições acima de 75% em todas as linhas celulares obtendo o máximo em HCT-116 atingindo 89,4% e valores menores em SF-295 obtendo 76,2%. AAFE mostra menor inibição em células PC-3 com 58,5% e maior atividade em SF-295 inibindo 98,6% das células.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos hexânico e etanólico obtidos da *Artemisia Absinthium* mostraram eficácia nos testes *in vitro* na inibição das células HTC116 (colón), em SF295 (sistema nervoso central) e PC-3 (próstata). Sendo de total importância para a sociedade a descoberta de novas substâncias capazes de combater o câncer.

Os efeitos secundários desfavoráveis do uso do extrato bruto são problemas graves, abrindo foco para pesquisas mais profundas sobre a *A. absinthium* no combate ao câncer, possibilitando a construção de trabalhos futuros para identificação dos compostos causadores das mortes celulares. Visando o desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes e seguros.

A identificação da molécula isolada e purificada por CCD está em fase de identificação. As análises espectrométricas ainda não foram concluídas, sendo estas essenciais para a caracterização da molécula.

Os testes citotóxicos *in vitro* com a molécula pura, usando a técnica MTT, serão solicitados após confirmação da elucidação estrutural, visando associar estrutura com atividade.

8. REFERÊNCIAS

- ABERHAM, A.; CICEK, S. S.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Analysis of Sesquiterpene Lactones, Lignans, and Flavonoids in Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Mass Spectrometry, Reversed Phase HPLC, and HPLC-Solid Phase Extraction-Nuclear Magnetic Resonance. **Food Chemistry**., v. 58, n. 20, 2010.
- BARRETO, F. S. Avaliação do potencial citotóxico de uma acetogenina isolada do extrato acetônico das folhas de *annona muricata*. UFC, 2013.
- BLAGOJEVIC, P; RADULOVIC, N; PALIC, R; STOJANOVIC, G; Chemical composition of the essential oils of Serbian wildgrowing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 13, p. 4780–4789, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Mulher**, Brasília/DF, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Regulação, Avaliação e Controle, Coordenação Geral de Sistemas de Informação, 2013.
- CÉSAR, I C et al. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 17. n. 4. p. 616-625. 2007.
- CHEMESOVA II; BELENOVSKAYA, L. M.; STUKOV, A.N. Antitumor activity of flavonoids from some species of *Artemisia* L. **Rastitel'nye Resursy**, v. 23, p. 100–3, 1987
- CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO, A. Biomaterials. **Journal Elsevier**, v. 17, p. 1259-1264, 1996.
- FERRARI, E. F; RIBEIRO, N. M; COSTA, R. S. C; OSÓRIO, R. A. L; BELTRAME JR., M; RIBEIRO, W. Cromatografia aplicada à etnofarmacologia para o desenvolvimento de novos fármacos. Disponível em http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2008/anaais/arquivosEPG/EPG00047_03_O.pdf, acesso em 10 de novembro de 2016
- GARCIA-CARBONERO, R.; SUPKO, J. G. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 641–661, 2002.
- GONZALEZ-COLOMA, A. et al. Major components of Spanish cultivated *Artemisia absinthium* populations: Antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects. **Industrial Crops and Products**, v. 37. p. 401-407, 2012.

GORDANIAN, B.; BEHBAHANI, M.; CARAPETIAN, J.; FAZILATI, M.; In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five *Artemisia* species. **Research Pharmpharmaceutical Sciences**; v. 9, n. 2, p. 91–96, 2014.

HAINSWORTH, J D.; GRECO, F. A. Etoposide: twenty years later. **Ann Oncol**, v. 6, p.325–341, 1995.

INCA, Instituto nacional de câncer. Disponível em:
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em 30 de julho de 2016.

INCA, Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Informações sobre o desenvolvimento e coordenação das ações integradas para a prevenção e o controle do câncer no Brasil, Disponível em: <<http://inca.gov.br>>. Acesso em: 7 de abril de 2014.

INCA, Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Disponível em:
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao>>. Acesso em: 21 de Dezembro de 2014.

INCA, Instituto Nacional de Câncer (Brasil). ABC do Câncer: Abordagens básicas para o controle. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2011.

INCA, Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Disponível em:
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao>> Acesso em: 26 de Março de 2015.

JORDAN, M. A.; THROWER, D.; WILSON, L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. **Cancer Research**, v. 51, p. 2212–2222, 1991.

JOSHI, R. K. Volatile composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing in Western Ghats region of North West Karnataka, India, **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 7, p. 888-892, 2013.

MATOS, A. F. (1997). **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivor: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAWAB, A.; YUNUS, M.; MAHDI, A.; GUPTA, S. Evaluation of anticancer properties of medicinal plants from the Indian subcontinent. **Molecular and Cellular Pharmacology**. v. 3, n. 1, p. 21–29, 2011.

RAZIS, E. D.; FOUNTZILAS, G. Paclitaxel: epirubicin in metastatic breast câncer a review. **Ann Oncol**, v. 12, p. 593–598, 2001.

ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. Toxicology in Vitro, **Journal Elsevier**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROGERO, S. O; LUGÃO, A. B; IKEDA T. I; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Teste Materials Research**, v. 6, N. 3, p. 317-320, 2003.

SAXENA, M.; SHUKLA, S. Reversal of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury by Aqueous Extract of Artemisia absinthium in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**. v. 31, N. 4, p. 325-334, 2012.

SHAFI, G.; HASAN, T. N.; SYED, N. A.; AL-HAZZANI, A. A.; ALSHATWI, A. A.; JYOTHI, A.; MUNSHI, A. Artemisia absinthium (AA): a novel potential complementary and alternative. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 7, p. 7373-9, 2012.