

ESTUDO FITOQUÍMICO E ANTITUMORAL *IN VITRO* DA FRAÇÃO ATIVA METANÓLICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *HIMANTANTHUS DRASTICUS* (HDFE-M2)

Thelys Ramom Fonsêca¹, Cláudio Costa dos Santos²

1 – Autor; 2 – Orientador

Resumo: A utilização de plantas medicinais constituiu o primeiro método terapêutico usado pelos povos nas antigas civilizações. O Brasil é detentor de uma grande diversidade de espécies vegetais, porém poucas possuem comprovação científica de seus efeitos benéficos à saúde humana. *Himatanthus drasticus*, mais conhecida por janaguba no Nordeste brasileiro, é difundida popularmente na cura do câncer, entretanto existem poucos estudos que embasem os relatos populares. O objetivo deste trabalho foi investigar o princípio ativo responsável pela atividade antitumoral *in vitro* da fração metanólica confirmada pelo teste de MTT. Métodos cromatográficos foram utilizados no isolamento dos metabólitos secundários do extrato etanólico das folhas de *H. drasticus* (HDFE-M2). As avaliações da citotoxicidade *in vitro*, através do método do MTT para 3 linhagens de células tumorais, mostraram resultados promissores com porcentagens acima de 75% de inibição nas três células cancerígenas: HCT-116 (Câncer de Colo), SF-295 (Câncer de Cérebro) e PC-3 (Câncer de Próstata).

Palavras-chave: *Himatanthus drasticus*; Atividade antitumoral *in vitro*; Cromatografia em Camada Delgada Preparativa;

1. Introdução

O uso de plantas medicinais no combate a doenças surgiu como via primária em diversas civilizações. Apesar de serem utilizadas como alimentos, as plantas também tinham funções medicamentosas [1].

Em muitas comunidades já se assimilaram o uso de plantas medicinais como fator de grande importância para a manutenção e conservação de sua saúde. E, apesar de mostrar ação benéfica, as aplicações de plantas na cura de doenças refletem a construção do conhecimento de um povo que é transmitido de geração a geração [1].

Dados mostram que o crescimento do uso de plantas medicinais no Brasil é favorecido pela grande diversidade da flora e pelos efeitos benéficos de algumas plantas no tratamento de doenças; a quantidade estimada de 60.000 espécies vegetais catalogadas, mostra que apenas 8% tiveram seus compostos bioativos analisados, enquanto que em apenas 1.100 dessas espécies foram determinadas suas qualidades medicinais. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), um contingente mundial de 80% são submetidos ou fazem uso da medicina primária, e destes usuários, cerca de 85% têm o hábito de usar algum tipo de planta, ou condensado vegetal e seus princípios ativos, na manipulação de medicamentos [2].

A ciência tem se preocupado em pesquisar e validar o conhecimento da medicina tradicional por meio do aparato tecnológico, dando assim um valor terapêutico às plantas medicinais [3]. Utilizada como terapia em diversas doenças adquiridas por seres humanos, a janaguba (*Himatanthus drasticus*) é uma espécie nativa do Brasil, especificamente da região Nordeste, pertencente à família da Apocynaceae. Classificada como uma espécie arbórea, a janaguba pode adquirir um porte de até sete metros de altura, apresentando uma folhagem compacta nas extremidades dos ramos, podendo ser encontrada em várias regiões do Brasil [4].

Uma das regiões em que há uma extração e comercialização de forma descontrolada do látex da janaguba é o estado do Ceará. Essa remoção desregulada é praticada por comunidades locais que utilizam o látex para a comercialização. Frequentemente utilizado na medicação de úlceras gástricas, infertilidade feminina, menstruações irregulares, inflamações e sintomas da menopausa. Ademais, a janaguba detém de um histórico no uso da cura do câncer, contudo não possui registros relevantes na literatura química [5].

Estatísticas mostram que um grande número de pessoas já foi diagnosticado com câncer no Brasil e no mundo. Isso tem provocado uma busca por métodos fitoterápicos que diminuam as sequelas deixadas no corpo humano, sabido que os tratamentos convencionais são bastante agressivos. Apesar de diversas

plantas serem utilizadas por muito tempo no tratamento do câncer, é na oncologia e em doenças infecciosas que se tem maior relevância do seu uso [6].

Em decorrência do crescimento da produção de fitoterápicos no país, o cuidado com a regulamentação e controle desses medicamentos tem aumentado. Assim, têm-se a necessidade de indicar quais os componentes ativos e seus mecanismos de ação presentes nas plantas. O gênero *Himatanthus* é pouco mencionado na literatura química, contudo existem relatos na literatura científica sobre a atividade anticâncer do extrato metanólico das folhas da janaguba [5]. Para esse estudo foi regulamentado o isolamento cromatográfico de um dos constituintes majoritários da fração metanólica obtidos a partir do extrato etanólico das folhas da *H. drasticus*, com interesse de reconhecer o princípio ativo com a função antitumoral *in vitro*, de antemão validada pelo teste do MTT.

2. Fundamentação Teórica

2.1 *Himatanthus drasticus*

De acordo com Amaro, o látex extraído da planta é largamente utilizado na região Nordeste do Brasil no combate ao câncer [4]. A *Himatanthus drasticus* faz parte da família da Apocynaceae, popularmente conhecida como tiborna, jasmim-manga e raivosa em Minas Gerais e Bahia, e como janaguba no Ceará, joanaguba no Rio Grande do Norte. Essa planta é predominante do Brasil nos Estados de Alagoas, Minas Gerais, Bahia, Pará, Sergipe, Pernambuco, Ceará, Paraíba, Piauí, Maranhão, Paraná, Roraima e Rio Grande do Norte. Sendo na Chapada do Araripe, no Ceará, sua maior incidência de exploração descontrolada [5].

Os aspectos morfológicos da *H. drasticus* conferem a mesma uma postura arbórea, podendo atingir até 7 m de altura, folhagens fechadas nas pontas dos galhos. Possui fruto variando de 12 a 30 cm de comprimento, sendo do tipo folículo, cilíndrico, ligeiramente arqueado, em forma de chifre, polispérmico, seco, deiscente e possui uma média de 42 sementes [4]. A casca é de textura rugosa e destila um líquido branco, o látex, onde é bastante utilizado em meios terapêuticos alternativos [7].

A forma de se extrair o “Leite da Janaguba”, o látex de *H. drasticus*, se dá por meio de cortes no caule da planta. A substância pura, de antemão, passa por um processo de dissolução, onde em seguida é comercializada para fins medicinais no Nordeste brasileiro. Inúmeras são suas aplicações por via oral, que se estende desde o tratamento de doenças como gastrite, úlcera, câncer, inflamações, entre outras [8]. Mesmo possuindo um grande uso na medicina tradicional, sua validação farmacológica deixa a desejar quanto a sua fundamentação científica.



Figura 1: Fotos da *Himatanthus drasticus* com detalhes dos galhos folhas e flores. (Arquivo Pessoal)

2.2 Preparação do extrato

O procedimento da extração está relacionado com a remoção de forma exclusiva e exaustiva de substâncias ou fração ativa pertencente a um material vegetal, e a utilização de um líquido ou mistura de líquidos cientificamente adequados e toxicologicamente sem riscos [9].

Além de se conhecer um número significativo de solventes (líquidos extratores), poucos têm utilização na extração dos compostos vegetais. A escolha do solvente deve estar condicionada com o seu maior grau de seletividade possível. Essa propriedade seletiva garante a remoção significativa de substâncias de interesse da análise. A dependência da seletividade com a polaridade faz com que se tenha conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja escolher para extrair, a fim de se saber, qual solvente ou mistura de solventes que tenham uma melhor aproximação do ótimo de seletividade para determinada extração [9].



Figura 2: Preparação dos extratos hexânico e etanólico. (Arquivo Pessoal)

2.3 Método Cromatográfico: Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia apresenta resultados adequados quanto ao uso de inúmeras técnicas associadas ao isolamento desejado de substâncias. Isso faz do método um dos mais eficientes e imediatos entre os diversos de separação e análise utilizados. Esse processo consiste no fracionamento de misturas, em seus componentes, de forma precisa e customizada [9].

Dentre os diversos tipos de cromatografia utilizados temos na cromatografia em camada delgada (CCD) a separação de componentes de uma mistura através da transferência diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente contida sobre uma superfície plana [10]. Ou seja, é um mecanismo de adsorção líquido-sólido, onde a separação ocorre pela diferença de compatibilidade dos constituintes de uma mistura pela fase estacionária [11]. Sendo assim, torna-se o tipo de cromatografia mais utilizado na separação de extratos de plantas, sobretudo os extratos obtidos com solventes pouco polares [10].

O processo cromatográfico é baseado na mistura a ser estudada, e pelas fases fixa e móvel. A fase fixa ou fase estacionária, é o meio sólido poroso (adsorvente), cuja função é reter os solutos (sorção). A fase móvel é o solvente (eluente), que se desloca através da fase fixa, e tem como função transportar os solutos (dessorção). Nesse processo, o composto dissolvido é migrado por meio da fase fixa, através do fluxo constante da fase móvel [10]. Deste modo, cada um dos constituintes é seletivamente retido pela fase estacionária, sendo assim, os constituintes da amostra apresentam velocidades diferentes ao mover-se pela fase estacionária.

A eficiência deste tipo de cromatografia está relacionada com a seleção adequada do adsorvente e do eluente quanto à polaridade dos constituintes da mistura que se pretende isolar. A separação de misturas pouco polares depende da natureza dos adsorventes ser fortes e eluentes fracos, à medida que misturas polares indica melhor transferência diferencial em sistema formado por adsorvente fraco com eluentes fortes. Um dos adsorventes mais utilizados de forma confiavelmente em cromatografia por adsorção é a sílica (SiO_2). O ácido silício amorfo apresenta alta porosidade e é levemente ácido, podendo intensificar sua acidez na presença de impurezas ácidas, por efeito de fenômenos a quimiosorção de bases ou reações ácidos-catalisados das amostras. Este material serve para separar compostos lipofílicos como aldeído,

cetonas, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, alcaloides, terpenóides e esteroides a partir do processo de adsorção [12].

Para se obter as estruturas químicas correlatas, os constituintes puros devem ser submetidos às técnicas espectroscópicas e métodos químicos. Ou seja, em todo estudo especulativo referente a produtos naturais são necessários remover os constituintes vegetais, analisar, e purificar os constituintes presentes nas extrações obtidas [9].

3. Metodologia

3.1. Material Vegetal

As folhas da janaguba (*H. drasticus*) foram coletadas município de Araioses- MA e identificadas pelo botânico Dr. Leandro de Oliveira Furtado de Sousa, cuja exsicata encontra-se depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima existente (UFERSA) sob o nº 14987.

3.2. Fracionamento do Extrato Metanólico das Folhas de *H. drasticus*

Os seguintes procedimentos foram realizados em estudos anteriores. As folhas foram secas em estufa por um período de sete dias a temperatura de 45°C. Decorrido o tempo necessário, as folhas foram trituradas e em seguida colocadas no percolador juntamente com o solvente para que este extraísse as substâncias de interesse da planta. O tratamento com solventes foi realizado utilizando hexano seguido de etanol em 273g de material. Primeiramente foi utilizado o hexano que é um solvente de baixa polaridade, extrai da planta mistura e compostos de polaridade baixa e compostos polares pouco hidrófilos. Após 72 horas de extração a frio o hexano foi filtrado, desse modo, após concentração em evaporador rotativo, foi adquirido o extrato hexânico das folhas da *H. drasticus* designado como (HDFH). Seguindo a mesma metodologia foi realizada a extração a frio com etanol, obtendo-se o extrato etanólico das folhas de *H. drasticus* (HDFE). Ambos os extratos HDFH e HDFE foram submetidos ao teste MTT para avaliar a atividade antitumoral *in vitro*. O resultado positivo para o extrato polar HDFE foi determinante para a continuidade do trabalho.

A partir da técnica de cromatografia líquida gravitacional em Coluna Aberta (CC) realizada por SILVA (2015) em trabalho prévio, HDFE foi fracionado utilizando os solventes de acordo com o gradiente de polaridade dos mesmos, partindo do menor para o de maior polaridade. A sequência realizada foi: hexano (HDFE-H), diclorometano (HDFE-D), acetato de etila (HDFE-A) e metanol (HDFE-M). As frações obtidas foram novamente submetidas a novos testes para a confirmação da atividade antitumoral *in vitro*, sendo que apenas as frações HDFE-A e HDFE-M obtiveram testes positivos [13].

A fração metanólica do extrato etanólico das folhas de *H. drasticus* (HDFE-M2, m = 5,0669g) foi escolhido como material para a realização desta etapa do estudo.



Figura 3: Fração metanólica (HDFE-M2) obtida por métodos cromatográficos.

3.3 Teste de citotoxicidade *in vitro*

As células em suspensão ou em monocamadas foram plaqueadas em placas de multicavidades de 96 poços. Após 24 horas de incubação, 100 μ L 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 μ L 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 CO₂ 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 μ L 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 [14].



Figura 4: Placas de multicavidades de 96 poços.

3.4. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Para execução da cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), foram utilizadas placas cromatográficas dimensionadas em 20 x 20cm e espessura de 0,20mm constituídas de alumina em gel de sílica 60 com indicador de fluorescência F254 (SILICYCLE). Para o isolamento e purificação dos constituintes de HDFE-M2 foram realizadas 2 placas preparativas nas quais foram aplicadas 40mg de material por placa. Inicialmente a CCDP foi marcada uma linha base com grafite nas seguintes dimensões: 2cm acima da borda inferior e 1,5cm de distância das bordas laterais, onde a amostra foi aplicada com o auxílio de tubos capilares sobre toda a linha. Em seguida, a cromatofolha foi colocada na cuba cromatográfica de vidro contendo 30ml de hexano e 10 ml de metanol para que o eluente, fase móvel, arraste a amostra através na CCDP, fase estacionária. Para a purificação das substâncias de interesse, separadas pelo método de CCD, foi preciso fazer uma extração em fase sólida a partir das faixas de substâncias desejadas. As seis bandas cromatográficas foram raspadas e a sílica contendo as substâncias retidas foram submetidas à extração com 15 mL de metanol por três vezes, sendo a solução filtrada e concentrada por evaporação. Dentre as seis bandas cromatográficas isoladas, a escolhida foi a banda quatro para análise espectroscópica com maior probabilidade de se ter o composto ativo.



Figura 5: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa de HDFE-M2

4. Resultados e Discussão

4.1 Atividade antitumoral *in vitro*

Os extratos obtidos das folhas da *H. drasticus*, HDFH e HDFE, foram testados no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE-UFC) por meio do ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT, em concentração única 10 miligramas/mL de extrato. Os resultados encontram-se descritos nos gráficos a seguir, mostrando a porcentagem de inibição das células cancerígenas para diversos extratos de várias plantas.

As frações provenientes do extrato HDFE foram testadas e a análise demonstrou que a fração metanólica HDFE-M2 mostra uma porcentagem promissora acima de 75% de inibição nas linhagens HCT-116, SF-295 e PC-3. Foi observado que nas células HCT-116 a inibição foi acima de 90,0% e para SF-295 e PC-3 apenas acima de 75,0%.

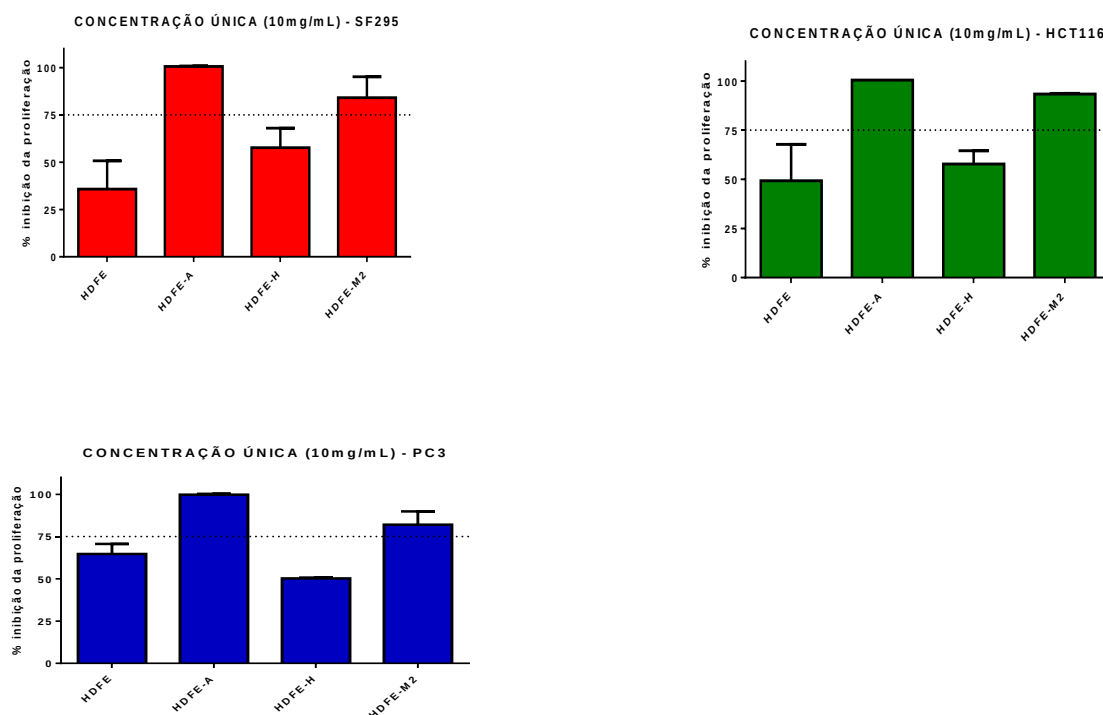


Figura 6: Avaliações da citotoxicidade *in vitro* em dose única, através do método do MTT após 72 horas de incubação frente a 3 linhagens de células tumorais.

5. Conclusão

O ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT *in vitro* dos extratos obtidos das folhas da *H. drasticus*, HDFH e HDFE, apresentou resultados promissores de inibição das células cancerígenas das linhagens HCT-116 (Câncer de Colo), SF-295 (Câncer de Cérebro) e PC-3 (Câncer de Próstata).

A banda cromatográfica isolada quatro foi enviada para análise de RMN, porém o composto não se encontrava puro e o resultado não pode ser usado.

Os resultados positivos da inibição das células cancerígenas *in vitro* da fração metanólica da *H. drasticus*, podem posteriormente serem comprovadas em testes *in vivo*, em busca de produzir, num futuro próximo, um medicamento fitoterápico eficaz no tratamento ao câncer em seres humanos.

6. Referências

- [1] TOMAZZONI, Marisa Ines; BONATO NEGRELLE, Raquel Rejane; CENTA, Maria de Lourdes. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, 2006.
- [2] GADELHA, Claudia Sarmiento et al. Utilização de fitoterápicos e plantas medicinais em diferentes segmentos da sociedade. **Programa de Pós Graduação em Sistemas Agroindustriais (24-Mestrado Profissional) Dissertações**, v. 4, n. 1, p. 50 p, 2015.
- [3] ARNOUS, Amir Hussein; SANTOS, Antonio Sousa; BEINNER, Rosana Passos Cambraia. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- [4] AMARO, Manoel Silva et al. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.-Apocynaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 01, p. 63-71, 2006.
- [5] SOUSA, Eliane Leite de et al. Antitumor activity of leaves of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.-Apocynaceae (janaguba) in the treatment of Sarcoma 180 tumor. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 199-203, 2010.
- [6] NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.; SNADER, Kenneth M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. **Journal of natural products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.
- [7] LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.
- [8] MATOS, Mayara Patrícia Viana de. Aspectos bioquímicos e etnofarmacológicos do látex de *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel). 2013. xix, 89 f. : Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, **Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**. Fortaleza-CE, 2013.
- [9] PINTO, Marco Aurélio Sampaio et al. Técnicas de separação e identificação aplicadas a produtos naturais. 2005.
- [10] MATOS, Francisco José de Abreu. **Introdução à fitoquímica experimental**. Edições UFC, 1997.
- [11] A.L.G. Degani, Q.B. Cass, P.C. Vieira, **Cromatografia um breve ensaio**, Química Nova Escola., n.7, 1998.
- [12] COLLINS, Carol H., BRAGA, G. L., BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 6ª. Ed. Campinas. Editora da Unicamp, 1995. 279p.
- [13] SILVA, Jessyca Graziely Alves da. Estudo fitoquímico e antitumoral do extrato etanólico das folhas da janaguba *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, 2015. 34f. Monografia (Bacharel em Ciências e Tecnologia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

[14] 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.