

Avaliação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. sobre células normais e tumorais

Assessment of the cytotoxic activity of ethanol extracts from the bark and leaves of terminalia fagifolia mart. on normal and tumor cells

Patrícia Siqueira de Melo Rodrigues¹, Aparecido Osdimir Bertolin², Tamara Mieco Fucase³, Fernanda Mouro Galluzzi⁴, Evellin Caroline Silva³, Maria Helena Bellini Marumo⁵

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Palmas, TO, Brasil. 2. Docente da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Porto Nacional, TO, Brasil. 3. Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil. 4. Discente do curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo (CUSC), São Paulo, SP, Brasil. 5. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

Resumo

Introdução: A procura por novas alternativas terapêuticas, como as que utilizam as plantas medicinais, tem despertado grande interesse da comunidade científica na busca por tratamentos mais eficientes para as doenças, incluindo o câncer. *Terminalia fagifolia* Mart. é uma planta medicinal encontrada no Cerrado brasileiro, usada popularmente no tratamento de aftas e tumores. **Objetivos:** Avaliar a atividade citotóxica dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* em linhagens celulares NIH 3T3 e L929 e tumorais PC3 e B16F10. **Métodos:** Foi realizada a metodologia de determinação da viabilidade celular em ensaio com monocamada de células utilizando o ensaio MTS. As linhagens NIH 3T3, L929, PC3 e B16F10 foram expostas por 24 horas a diferentes concentrações dos extratos etanólicos da casca e folhas da *Terminalia fagifolia*. **Resultados:** Os resultados adquiridos mostraram que os extratos apresentaram viabilidade celular, sendo considerada de moderada a alta, para as células normais NIH 3T3 e L929 e citotoxicidade severa para as células tumorais PC3 e B16F10. Dessa forma, torna-se necessária a continuidade dos estudos com essa planta, pois os extratos da casca e das folhas apresentaram atividades antitumorais muito promissoras. **Conclusões:** Os extratos da casca e das folhas demonstraram viabilidade celular $\geq 50\%$ nas linhagens celulares normais NIH 3T3 e L929 e demonstraram atividade citotóxica para as linhagens tumorais PC3 e B16F10, apresentando redução da viabilidade celular em torno de 60% e 70%, respectivamente.

Palavras-chave: Terminalia fagifolia. Citotoxicidade. MTS. Viabilidade celular

Abstract

Introduction: The search for new therapeutic alternatives, as the ones that use medicinal plants, has awoken a huge interest from the scientific community in seeking through more efficient treatments for diseases, including cancer. *Terminalia fagifolia* Mart. is a medicinal plant found in Brazilian "Cerrado", popularly used in aphthas and tumor treatment. **Objectives:** To evaluate the cytotoxic activity of ethanolic extracts of the bark and leaves of the *Terminalia fagifolia* in cell lines NIH 3T3 and L929 and tumor cells PC3 and B16F10. **Methods:** The determination methodology in cellular viability was held in an assay with cells monolayer's using the MTS assay. The NIH 3T3, L929, PC3 and B16F10 lines was exposed for 24 hours in different ethanolic extracts concentrations. **Results:** The acquired results showed that the extracts had cellular variability is considered moderate to high for the normal cells NIH 3T3 and L929 and severe cytotoxicity to tumor cells PC3 and B16F10. This way, it is necessary to continue studying this plant, since both the bark and leaves extracts have great antitumor activity. **Conclusion:** The bark and leaves extracts showed cellular variability $\geq 50\%$ in normal cell lines NIH 3T3 and L929 and demonstrated cytotoxic activity for tumor cells PC3 and B16F10, presenting reduction of cell variability around 60% and 80%, respectively.

Key words: Terminalia fagifolia/ Cytotoxicity/ MTS/ Cell Survival.

INTRODUÇÃO

O Bioma Cerrado é o segundo maior Bioma da América do Sul, ocupando mais de 200 milhões de hectares do território brasileiro. Ele abrange os estados de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Tocantins, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, e parte dos estados do Paraná, Bahia, Ceará, Maranhão, Rondônia, Roraima, Amazônia, Pará e São Paulo^{1,2,3}. Vários autores apresentam e defendem a importância deste Bioma por sua alta biodiversidade. No que diz respeito à vegetação, o

Cerrado ultrapassa doze mil espécies, das quais, grande parte, apresenta valor alimentício e medicinal^{4,5}. Inúmeras são as espécies de plantas do Cerrado que são foco de investigações científicas visando à descoberta de moléculas, biologicamente ativas e, com potencial terapêutico⁶.

A espécie *Terminalia fagifolia* Mart. faz parte da família Combretaceae, a qual é constituída 18 gêneros, sendo o gênero

Correspondência: Patrícia Siqueira de Melo Rodrigues. Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Avenida NS 15, 109 - Plano Diretor Norte, 77001-090, Palmas, Tocantins, Brasil. E-mail: ptcsiqueira@gmail.com

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido em: 17 Out 2016; Revisado em: 10 Jan 2017; Aceito em: 21 Fev 2017

Terminalia composto por cerca de 200 espécies⁷.

A *Terminalia fagifolia* Mart. é conhecida, popularmente, como capitão-do-mato, mirindiba e pau-de-bicho no cerrado brasileiro⁸. Sua casca e o seu caule são utilizados, na medicina popular, como digestivo, no tratamento de afecções do estômago e do intestino⁹ e também, no combate a aftas e tumores⁸.

Diversos estudos com extratos de *Terminalia fagifolia* Mart. Resultaram no isolamento de metabólitos secundários (triterpenos pentacíclicos e seus derivados glicosilados, flavonoides, taninos e outros compostos aromáticos) com várias atividades biológicas de grande importância na área médica, destacando-se: anticancerígena, antimalárica, antifúngica, hepatoprotetora, antibacteriana, anti-herpes e anti-HIV^{10,11,12,13,14}

O câncer é considerado uma doença genética na qual mutações em oncogenes e genes supressores tumorais acarretam alterações nos mecanismos associados ao controle da divisão e diferenciação celular e, também, nos processos apoptóticos^{15,16,17}

Nos últimos anos, houve grande avanço no desenvolvimento de drogas antitumorais capazes de bloquear vias específicas de sinalização celular. Entretanto, um reflexo significativo na sobrevida dos pacientes não foi observado¹⁸.

Pesquisas em busca de novos fármacos com atividades antitumorais e reduzido efeito colateral têm sido de grande relevância. Ainda existe uma gama de tumores que não possuem uma terapêutica eficaz além de causarem a diminuição de leucócitos, expondo o paciente a infecções.^{19,20,21,22}

Diante desse panorama, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos dos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* quanto à citotoxicidade em linhagens normais de fibroblastos NIH 3T3 e L929 e linhagens tumorais B16F10 e PC3, pelo fato de essa planta ser utilizada como antitumoral por comunidades da região do Cerrado e apresentar constituintes químicos importantes.

MÉTODOS

Culturas celulares

As linhagens celulares utilizadas foram: NIH 3T3 (fibroblastos de camundongos), L929 (fibroblastos de camundongo), PC3 (câncer de próstata humano) e B16F10 (melanoma murino) cultivadas no Laboratório de Cultura de Células do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. Os ensaios foram realizados sob condições assépticas, em ambiente controlado, utilizando materiais e reagentes esterilizados.

As células L929, PC3 e B16F10 foram mantidas em meio de

cultura RPMI (Gibco), e as células NIH 3T3, foram mantidas em meio DMEM. Tanto o RPMI quanto o DMEM foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% da solução de estreptomicina/penicilina/anfotericina (antibiótico e antimicótico) (Gibco) e 1% de L-Glutamina (Gibco).

As passagens para amplificação de cultura foram realizadas a partir da tripsinização (tripsina/EDTA) das células e contagem em câmara de Neubauer. Após atingirem 80% de confluência as células foram plaqueadas para ensaio de citotoxicidade e congeladas para estoque das linhagens²³.

Avaliação da citotoxicidade

O ensaio de MTS é um método colorimétrico baseado na biorredução do composto [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium], em um produto cromogênico solúvel em meio de cultura (formazan), o qual adquire uma coloração violácea. Este processo é realizado apenas por enzimas mitocondriais de células viáveis; dessa forma, a mudança na coloração do meio de cultura reflete diretamente a viabilidade celular, podendo ser medida em absorbância²⁴.

Para a realização deste ensaio, as células (1×10^5 /poço), em quadruplicata, foram semeadas em placas de 96 poços. Em cada poço foram aplicados 20 μ L da solução Cell Titer96 (MTS - O ensaio de MTS é um método colorimétrico baseado na biorredução do composto [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium], em um produto cromogênico solúvel em meio de cultura (formazan), o qual adquire uma coloração violácea. Este processo é realizado apenas por enzimas mitocondriais de células viáveis; dessa forma, a mudança na coloração do meio de cultura reflete diretamente a viabilidade celular, podendo ser medida em absorbância.), a placa foi agitada para homogeneização da solução e mantida, por duas horas, em estufa de CO₂, a 37°C. Após esse período de incubação, as placas foram lidas em comprimento de ondas de 490 nm²⁵ utilizando o leitor de microplacas Multiskan EX (Labsystems, Milford, MA, EUA).

Coleta do material vegetal e preparação dos extratos

Seleção da espécie em estudo

A espécie em estudo foi escolhida baseada nos conhecimentos empíricos de curandeiros, pertencentes à comunidade de remanescentes de negros quilombolas Mumbuca, localizada na região do Jalapão – TO.

Coleta do material botânico e Identificação

Cascas e folhas da *Terminalia fagifolia* foram coletadas no mês de janeiro de 2015 na Comunidade Quilombola Mumbuca, a aproximadamente 40 km da cidade de Mateiros na região do Jalapão – TO (Coordenadas GPS: S 10° 41' 478" / W 046° 24' 214" Elevação em relação ao nível do mar: 371 m. Para coleta

e herborização do material, foram seguidas as técnicas usuais em trabalhos botânicos^{22,27}. Todo o material coletado foi identificado e depositado no Herbário HTO da Universidade Federal do Tocantins sob o registro de número 10842, sob a responsabilidade do Botânico Rodney Haulien Oliveira Viana.

Preparação do extrato

O material vegetal coletado no mês de janeiro de 2015 foi acondicionado separadamente em sacos de papel, identificado e levado à estufa para secagem, mantido a uma temperatura média de 60° C, durante sete dias. O material vegetal já seco, casca e folhas, foram triturados separadamente em moinho de facas (MARCONI, Mod. MA-340/A) e acondicionado em recipientes de vidro (3 L). Posteriormente, estes vidros contendo as partes vegetais moídas foram preenchidos com etanol 70%, para a solubilização dos princípios ativos. Após 72 horas, as soluções foram filtradas com a utilização de bomba a vácuo, funil de Büchner e papel filtro em que o extrato foi separado dos componentes sólidos e concentrado em Evaporador Rotativo (MARCONI, Mod. MA120-TH), obtendo-se assim, os extratos brutos de cada parte vegetal coletada. Em seguida, estes extratos brutos foram liofilizados seguindo o protocolo padrão de liofilização em Liofilizador (LIOTOP/ Mod. L101) para a retirada do excesso de solvente, por um tempo de aproximadamente 24 horas, para obtenção de extratos do tipo pó.

O rendimento do extrato foi estimado utilizando-se a expressão matemática: Rendimento (%) = (massa do extrato/massa do material vegetal) x 100 utilizando a seguinte equação, em que TEA = teor de extrato total (%); Mi = massa inicial da amostra (g); Mf = massa final do extrato seco (g)²⁸.

$$TEA (\%) = \frac{Mf}{Mi} \times 100$$

Estimativa de rendimentos dos extratos

A massa seca total das cascas e folhas da *Terminalia fagifolia* foi de 716 g e 157,58 g, respectivamente, e após a liofilização obteve-se 76,81 g e 46,79 g, respectivamente, apresentando um rendimento de 10,72% para as cascas e 29,69% para as folhas da *Terminalia fagifolia*.

Diluição dos extratos

Preparou-se uma solução mãe dos extratos liofilizados da casca e folhas da *Terminalia fagifolia* da seguinte forma: colocou-se em um falcon 100 µL de DMSO e adicionou-se 20 mg do extrato liofilizado e logo após acrescentou-se 900 µL de meio RPMI. Dessa forma, obteve-se uma concentração de extrato de 20 mg/mL, diluído em meio de cultura com 10% de DMSO.

Avaliação da citotoxicidade do DMSO

Para a avaliação da citotoxicidade do DMSO foram utilizados 5 *eppendorfs* estéreis. No primeiro *eppendorf* acrescentou-se 990 µL de meio DMEM e 10 µL de DMSO, obtendo uma concentração de 1% de DMSO. Nos demais *eppendorfs* acrescentou-se 500 µL do meio DMEM. Do primeiro *eppendorf* retirou-se um alíquota de 500 µL (solução de 990 µL de meio DMEM mais 10 µL de DMSO) realizando logo após diluições seriadas, transferindo-se 500 µL do *eppendorf* anterior para o subseqüente desprezando-se 500 µL no final, variando a diluição 1:1 até 1:16 obtendo-se as seguintes concentrações: 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,0625% e 0,03125%.

Avaliação da atividade citotóxica dos extratos pelo ensaio MTS

Após 24h desde que as células foram semeadas como descrito anteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura contendo os extratos.

As concentrações finais nos poços foram: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,03125 mg/mL; 0,015625 mg/mL. Para o controle positivo, foram utilizados oito poços com células em meio DMEM. As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com PBS e o ensaio MTS foi realizado.

Análise estatística

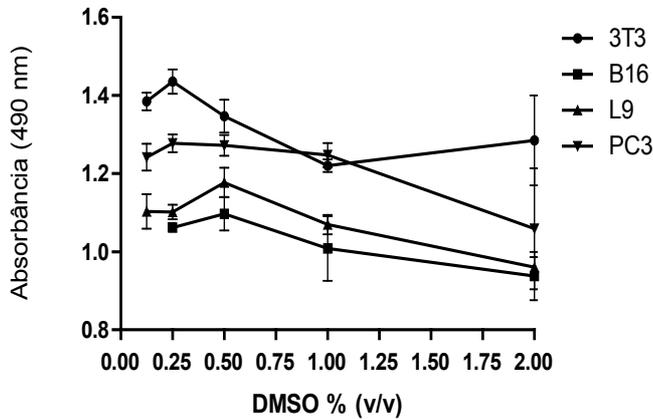
Os ensaios biológicos foram submetidos à análise estatística pelo teste Two-way seguido pelo pós-teste Bonferroni, usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando p < 0,05.

RESULTADOS

Após 24 horas de exposição das linhagens normais de fibroblastos NIH 3T3 e L929 e das linhagens de células tumorais PC3 e B16F10 aos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia*, foi realizada avaliação da viabilidade celular (sobrevivência das células) em cada diluição dos extratos (tratamentos), sendo que os valores de absorbância obtidos foram convertidos em % de viabilidade celular em relação às células expostas aos diferentes tratamentos, tendo como grupo controle negativo o DMSO em meio DMEM, considerado como 100% (controle positivo).

Ao realizar a avaliação da citotoxicidade do DMSO (expresso em porcentagem) sobre as culturas celulares determinou-se, a concentração máxima de DMSO que poderia ser utilizada nas concentrações dos extratos sem causar morte celular sendo 1% (Figura1).

Figura 1. Ensaio de citotoxicidade do DMSO sobre as culturas celulares NIH 3T3, L929, PC3 e B16F10.



Nos testes de viabilidade celular com os extratos da Terminalia fagifolia, observou-se que para o extrato da casca, a viabilidade das células normais NIH 3T3 foi superior a 70% para as concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL, quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 2). Para o tratamento com os extratos das folhas, a viabilidade celular das células normais NIH 3T3 foi superiores a 90% nas concentrações de 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,03125 mg/mL e 0,015625 mg/mL, quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 3).

Figura 2. Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células normais NIH 3T3 após tratamento com extrato da casca da Terminalia fagifolia com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = $p < 0,001$ em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.

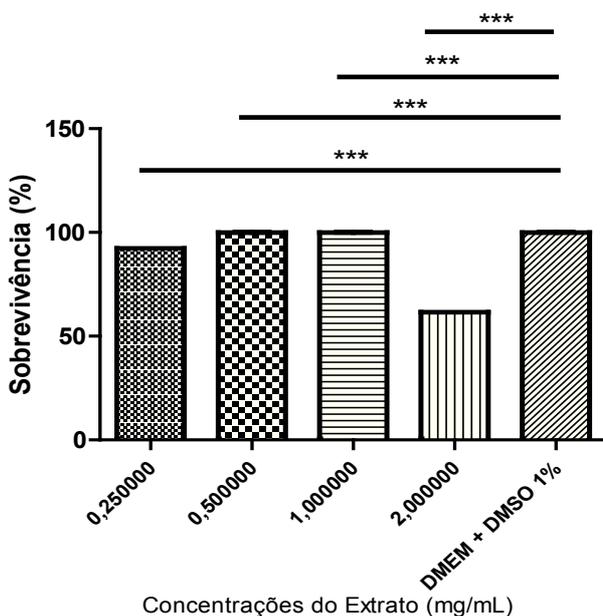
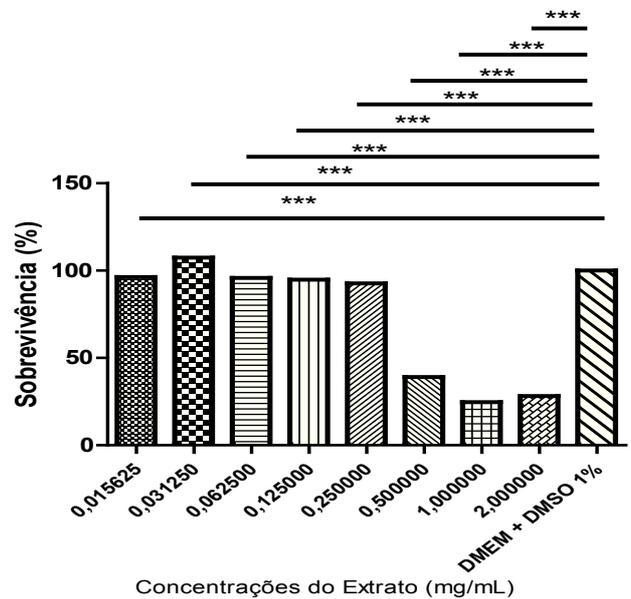
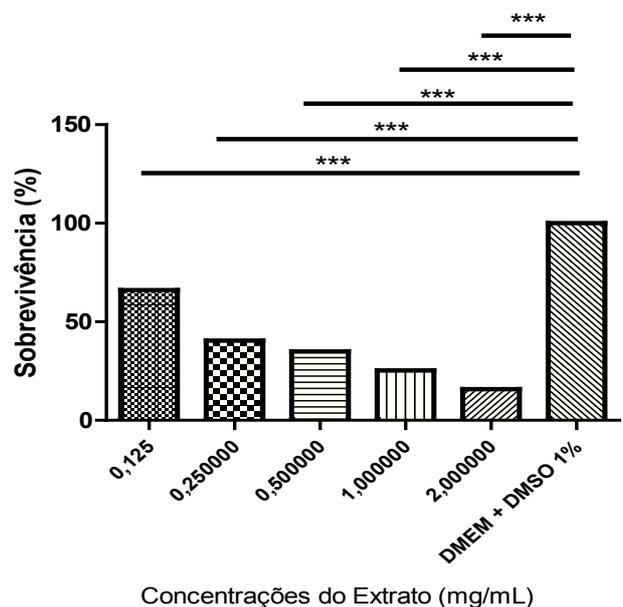


Figura 3. Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células normais NIH 3T3 após tratamento com extrato das folhas da Terminalia fagifolia com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = $p < 0,001$ em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.



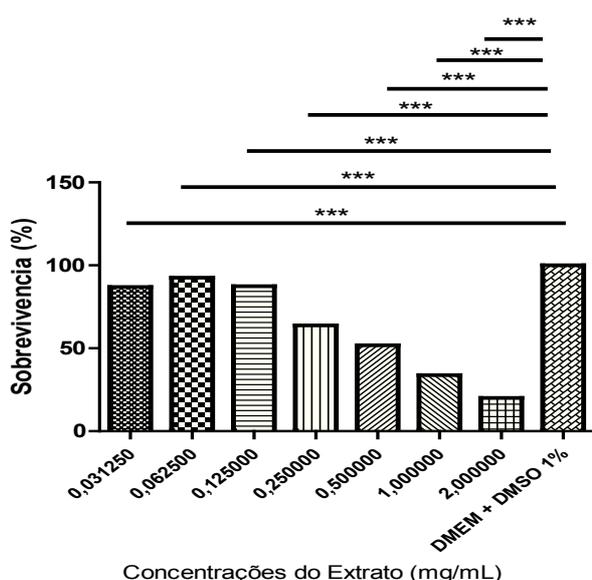
Quanto ao mesmo teste realizado com o extrato da casca da Terminalia fagifolia frente às células normais L929, houve viabilidade celular superior a 50% das células somente para a concentração de 0,125 mg/mL quando comparada ao grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 4).

Figura 4. Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células normais L929 após tratamento com extrato da casca da Terminalia fagifolia com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = $p < 0,001$ em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.



Para o extrato das folhas, houve viabilidade destas células superior a 50% para as concentrações de 0,03125 mg/mL até 0,5 mg/mL, quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$), sendo que na concentração de 0,0625 mg/mL a viabilidade celular chegou a 90% (Figura 5).

Figura 5. Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células normais L929 após tratamento com extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = $p < 0,001$ em comparação com grupo o tratado com DMEM + DMSO 1%.



Observando as concentrações do extrato da casca *Terminalia fagifolia*, a melhor atividade de redução da viabilidade celular em células tumorais PC3 ocorreu apenas na concentração de 2 mg/mL, quando comparada ao grupo controle ($p < 0,001$). As demais concentrações apresentaram viabilidade celular acima de 60% (Figura 6). Em relação ao extrato das folhas, houve redução da viabilidade celular para as células tumorais PC3 na concentração de 0,25 mg/mL e 2 mg/mL quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$). As demais concentrações apresentaram viabilidade celular acima de 70% (Figura 7).

Nas concentrações do extrato da casca *Terminalia fagifolia*, houve redução da viabilidade celular para as células tumorais B16F10 em todas as concentrações quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 6). E para as concentrações do extrato das folhas, houve redução da viabilidade celular para as células tumorais B16F10 nas concentrações de 0,25 mg/mL (comportamento não esperado para essa concentração), 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 2 mg/mL quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 7).

Figura 6. Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células tumorais PC3 e B16F10 após tratamento com extrato da casca da *Terminalia fagifolia* com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = $p < 0,001$ em comparação com o grupo tratado com DMEM + DMSO 1%.

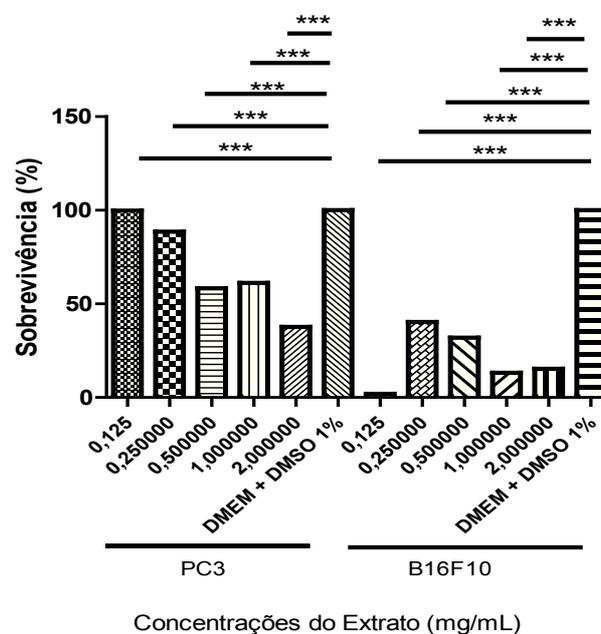
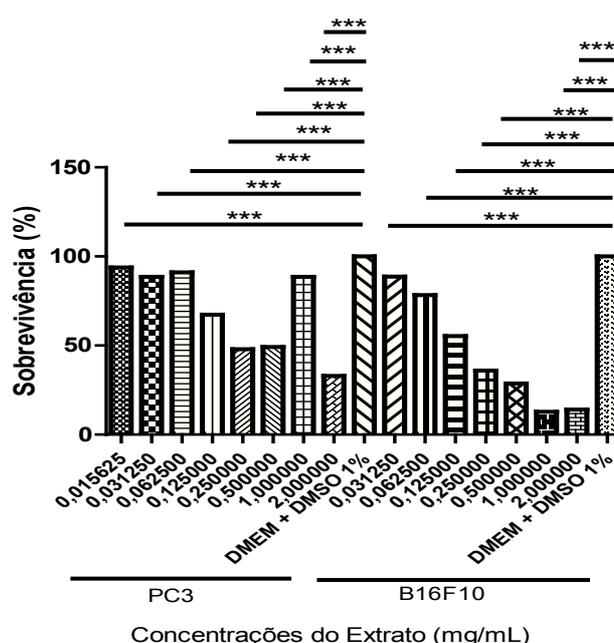


Figura 7. Análise da viabilidade celular (pelo teste MTS) de células tumorais PC3 e B16F10 após tratamento com extrato das folhas da *Terminalia fagifolia* com concentrações decrescentes em 24 horas de exposição. *** = $p < 0,001$ em comparação com grupo o tratado com DMEM + DMSO 1%.



DISCUSSÃO

Na análise dos resultados, fica evidente que o extrato das folhas mantém uma melhor viabilidade celular do que o extrato da casca para as linhagens normais NIH 3T3 e L929, sendo de 70% e 50%, respectivamente, e em concentrações menores que 0,5 mg/mL.

Em relação às linhagens tumorais PC3 e B16F10, observa-se que tanto o extrato das cascas quanto o extrato das folhas promoveram uma redução da viabilidade celular, ficando em torno de 60% a 70% para as duas linhagens tumorais, ressaltando que a linhagem celular tumoral B16F10 apresentou redução da viabilidade celular em concentrações menores que 0,25 mg/mL.

Em relação ao extrato da casca os dados adquiridos estão de acordo com os resultados encontrados por Garcez et al. (2006)¹⁰, em que substâncias isoladas do caule e da casca da *Terminalia fagifolia* apresentaram atividade citotóxica sobre células de carcinoma de laringe (HEP2) e células mucoepidermoide (H292) de câncer de pulmão, apresentando valores de IC50 na gama de 9,7-23,2 µg mL⁻¹ para ambas as linhagens.

Araújo et al. (2015)²⁷ ao realizarem testes do extrato da casca da *Terminalia fagifolia* em linhagem MCF-7 (câncer de mama), também obtiveram atividade antitumoral em potencial.

Ressalta-se que não foram encontrados na literatura trabalhos sobre atividade antineoplásica em linhagens celulares tumorais com o extrato das folhas da *Terminalia fagifolia*.

Existem vários trabalhos citando outras espécies do gênero *Terminalia* que foram investigadas quanto às atividades antineoplásicas e citotóxicas. A espécie *Terminalia arjuna* Wight & Arn. apresenta atividades anticâncer e citotóxica^{30,31} a espécie *Terminalia sericea* apresenta atividade citotóxica^{32,33} e *Terminalia catappa* L. que demonstra atividade anticâncer^{31,34}.

A ISO 10993-5³⁵ estabelece a classificação dos compostos em quatro categorias quanto à sua toxicidade, a saber: não citotóxico, levemente citotóxico, moderadamente citotóxico e severamente citotóxico. A partir dessa informação, pode-se inferir que o extrato da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* demonstraram citotoxicidade severa, respectivamente, para as linhagens tumorais PC3 e B16F10.

Conforme o *Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests*³⁶, para que o ensaio seja considerado aceitável, pelo menos uma das concentrações avaliadas deve apresentar citotoxicidade > 0% e ≤ 50% de viabilidade celular em células normais, e citotoxicidade em células tumorais > 50% e < 100%. Então, de acordo com esses parâmetros, foi verificado que o ensaio de viabilidade celular quantitativo pelo método colorimétrico com MTS apresentou valores que estão em conformidade com os critérios de aceitabilidade.

Estudos realizados com o intuito de conhecer as substâncias químicas presentes no extrato etanólico da casca da *Terminalia fagifolia* apresentaram vários constituintes químicos como flavanonas 1, 2, 4 - 8; chalconas 9 e 10; diaril propanos 11 e 12, flavana 13; ácido gálico 14; triterpenos 15 - 23 e o esteroide sitosterol^{10,37}. De e acordo com Ayres et al., (2009)⁸, o extrato das folhas apresenta a estrutura de um flavonoide (1), dois tocoferóis (3 e 4), três triterpenos em mistura (5-7) e dois esteroides (2 e 8).

Outros estudos relatam ainda, que o extrato das folhas desta espécie apresentou alto teor de compostos fenólicos, quando comparados a dados de outras espécies descritos na literatura^{38,39}.

Os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes de origem natural e têm chamado muito a atenção por sua função química e por apresentarem propriedades redutoras. Apresentam-se de várias formas, como: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas⁴⁰, constituintes estes presentes nos extratos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia*^{8,10,39}.

A procura por novas moléculas que apresentem atividades de inibição de células tumorais e que causem o mínimo de danos às células normais têm sido de grande relevância⁴¹ na busca por medicamentos mais efetivos para tratar tumores, reduzir a resistência do paciente às drogas, diminuir a toxicidade, aumentar a especificidade e biodisponibilidade de fármacos⁴².

Dessa forma, a crescente incidência e a resistência às terapias convencionais⁴³, têm levado à busca por novas estratégias terapêuticas para o melanoma, considerado o tipo de câncer de pele mais letal⁴⁴ e para o câncer de próstata considerado o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma⁴⁵.

O melanoma, quando comparado aos outros cânceres, apresenta uma das piores taxas de resposta à quimioterapia. Poucos agentes demonstram atividade antitumoral significativa contra o melanoma metastático⁴⁶. Com uma taxa de resposta a cada agente ou à combinação de agentes de 15 a 25%⁴⁷, cujo tratamento cirúrgico persiste sendo a primeira opção⁴⁸, com sobrevida de 1(um) ano⁴⁹.

O processo celular e molecular da metástase no melanoma é complexo e não completamente compreendido; porém, sabe-se que a sequência da disseminação das células neoplásicas envolve perda da adesão intracelular, invasão da derme, migração do sítio primário, penetração das células neoplásicas nos vasos sanguíneos e linfáticos, sobrevivência intravascular, adesão à vasculatura do tecido alvo e, por fim, migração, proliferação e angiogênese neste tecido⁵⁰.

A avaliação da citotoxicidade em células tumorais como a B16F10 e PC3 é de suma importância para pesquisadores e pacientes acometidos por essas doenças. Portanto, resultados relevantes, como os obtidos neste trabalho com os extratos da casca e das

folhas da *Terminalia fagifolia* podem ser considerados para futuros estudos de novas drogas antibacterianas e antitumorais.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio dos tratamentos das linhagens

celulares normais NIH 3T3 e L929 com os extratos etanólicos da casca e das folhas de *Terminalia fagifolia* demonstraram que houve uma viabilidade celular $\geq 50\%$. Entretanto, os mesmos extratos demonstraram atividade citotóxica para as linhagens de células tumorais PC3 e B16F10, apresentando redução da viabilidade celular em torno de 60% e 70%.

REFERÊNCIAS

- Dias BFS. Cerrados: uma caracterização. In Dias BFS. Alternativas de desenvolvimento dos cerrados. Brasília: Funatura-IBAMA; 1992. p. 11-25.
- Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Silva MC Junior, Rezende AV, Figueiras TS, et al. In: S.M. SANO e S.P. Almeida (Eds.). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: Embrapa; 1998. p. 289-556.
- Rodrigues VEG, Carvalho DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. Ciênc. agrotec. 2001 Jan-Fev; 25(1):102-123.
- Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA CPAC; 1998. p. 287 – 556.
- Souza CD, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. Acta Bot. Bras [Internet]. 2006 Jan-Mar [acesso 2015 Mar 8]; 20(1):135-142. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062006000100013. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062006000100013>.
- Costa - Lotufo LV, Montenegro RC, Alves APNN, Madeira SVF, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MO. A contribuição de produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. Rev Virtual Quim [Internet]. 2010 Ago 30 [acesso 2015 Dez 29]; 2(1):47-58. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/index.php/rvq/article/viewDownloadInterstitial/65/119>.
- Hartwell JL. Plants Used Against Cancer. Quarterman Publications, Inc., Lawrence, MA; 1982.
- Ayres MCC, Chaves MH, Rinaldo D, Vilegas W, Vieira GM Júnior Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. Quim Nova [Internet]. 2009 Ago [acesso 2014 Jul 8]; 32(6):1509-1512. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600028>.
- Freire FMT, Lopes AS, Meneses RCS. Plantas medicinais do trópico semi-árido do Piauí. Aspectos Botânicos. In: Produção Científica do Programa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Nordeste na UFPI. Teresina: UFPI; 1992. p. 160-172.
- Garcez FR, Garcez WS, Santana ALBD, Alves MM, Matos MFC, Scaliante AM. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). J Braz Chem Soc. [Internet]. 2006 Nov-Dez [acesso 2014 Jun 7 2014]; 17(7):1223-1228. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532006000700005. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532006000700005>.
- Garcez FR, Garcez WS, Miguel DL, Serea AA, Prado FC. Chemical constituents from *Terminalia glabrescens*. J Braz Chem Soc. [Internet]. 2003 Mai-Jun [acesso 2017 Jan 11]; 14: 461-465. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532003000300021. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532003000300021>.
- Katerere DR, Gray A I, Nash R J, Waigh RD. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. Phytochemistry. [Internet]. 2003 May [acesso 2016 Apr 18]; 63(1): 81-88.
- Araújo DS, Chaves MH. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. Quim Nova [Internet]. 2005 Fev 15 [acesso em 2014 Jul 8]; 28(6):996. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n6/26828.pdf>.
- Garcez FR, Garcez WS, Santana ALBD, Alves MM, Falcão TL. Estudo Químico de *Terminalia fagifolia* (Combretaceae) 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2005; São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, p. PN253; 2005. Disponível em: http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/111/38111199.pdf.
- Moffatt J, Hashimoto M, Kojima A, Kennedy DO, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H, Matsui-Yuas I. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascite tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3- action. Carcinogenesis [Internet]. 2000 Ago 22 [acesso 2016 Jan 2]; 21(12):2151-2157. Disponível em: <http://carcin.oxfordjournals.org/content/21/12/2151.full.pdf>.
- Bertram JS. The molecular biology of cancer. Mol Aspects Med. 2001 Dez; 21(6):167-223. doi:10.1016/S0098-2997(00)00007-8.
- Duesberg P, Rasnick D. Aneuploidy, the Somatic Mutation That Makes Cancer a Species of Its Own. Cell Motil Cytoskeleton [Internet]. 2000 Oct [acesso 2016 Jan 9]; 47(2):81-107. doi: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0169%28200010%2947%3C81::AID-CM1%3E3.0.CO;2-%23/pdf>.
- Jendiroba DB, Klostergaard J, Keyhani A, Pagliaro L, Freireich EJ. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapeutic-resistant leukemia cell lines by N-Ndimethylsphingosine. Leuk Res [Internet]. 2002 Mar [acesso 2016 Jan 8]; 26(3):301-310. Doi: 10.1016/S0145-2126(01)00129-1.
- Gallin JL, Snyderman R. Inflammation, 3. ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. 1335 p.
- Nevin KG, Vijayammal PL. Effect of *Aerva lanata* on solid tumor induced by DLA cells in mice. Fitoterapia [Internet]. 2003 Jan [acesso em 19 Jan 2016]; 74(6):578–582. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946721>. doi:10.1016/S0367-326X(03)00148-5.
- Pagno T, Blind LZ, Biavatti MW, Kreuger MRO. Cytotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich's tumor cells in mice. Braz J Med Biol Res [Internet]. 2006 Ago [acesso 2015 Dez 29]; 39(11):1483–1491. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2006001100012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000034>.
- Rozenblat S, Grossman S, Bergman M, Gottlieb H, Cohen Y, Dovrat S. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. Biochem Pharmacol [Internet]. 2008 Jan [acesso 2016 Jan 19]; 75(2):369–382. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919456>. doi:10.1016/j.bcp.2007.08.024.
- Freshney RJ edotor. Animal cell culture: a practical approach. Oxford: IRL press; 1986. p 248.
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun. 1991 Jul. 3(7):207-212. PubMed PMID:1867954.
- Fidalgo O, Bononi, VLR coordenadores. Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico. São Paulo: Instituto de Botânica; 1989 [acesso 2014 Jul. 12]. 61 p. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/fidalgo111/fidalgo-e-bononi-1989#>.
- Patel MI, Tuckerman R, Dong Q. A pitfall of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-

23 Avaliação citotóxica dos extratos etanólicos da *Terminalia fagifolia* Mart

yl)-5 (3-carboxymethoxyphenol)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay due to evaporation in wells on the edge of a 96 well plate. *Biotechnology Lett* [Internet]. 2005 Jun [acesso 2017 Jan 20]; 27(11):805-808. Disponível em: doi:10.1007/s10529-005-5803-x.

27. Mori SS, Lam LG, Coradin L. Manual de manejo do herbáceo fanerogâmico. Ilhéus: CEPLAC-CEPEC; 1989.

28. Pansera MR, Santos ACA, Paese K, Wasum R, Rossato M, Rota LD, et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. *Ver Bras Farmacogn* [Internet]. 2003 Jan-Jun [acesso em 2014 Jul 14]; 13(1):17-22. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2003000100002. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2003000100002>.

29. Araújo AR, Quelemes PV, Perfeito MLG, Lima LI, Sá MC, Nunes PHM, et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* [Internet]. 2015 Abr 19 [acesso 2016 Abr 7]; 14(1):1. Disponível em: <http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-015-0084-2>. doi: 10.1186/s12941-015-0084-2.

30. Dwivedi S. *Terminalia arjuna* wight & Arn- A useful drug for cardiovascular disorders. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2007 Nov [acesso 2016 Jan 8]; 114(2):114-129. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875376>. doi:10.1016/j.jep.2007.08.003.

31. Mandloi S, Srinivasa R, Varma RMR. Antifungal Activity of Alcoholic Leaf Extracts of *Terminalia Catappa* and *Terminalia Arjuna* on Some Pathogenic and Allergenic Fungi. *Advances in Life Science and Technology* [Internet]. 2013 [acesso 2016 Maio 8]; 8:21-24. Disponível em: <http://iiste.org/Journals/index.php/ALST/article/view/5949/6117>.

32. Eldeen IMS., Elgorashi EE., Mulholland DA., Staden JV. Anolignan B. A bioactive compound from the roots of *Terminalia sericea*. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2006 Oct [acesso 2016 Jan 10]; 103(1):135-138. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257162>. doi: 10.1016/j.jep.2005.09.005.

33. Mochizuki M., Hasegawa N. Anti-inflammatory effect of extract of *Terminalia sericea* Roots in an experimental model of colitis. *J Health Sci* [Internet]. 2007 Fev [acesso 2016 Abr 8]; 53(3):329-331. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237542148_Anti-inflammatory_Effect_of_Extract_of_Terminalia_Sericea_Roots_in_an_Experimental_Model_of_Colitis. doi: doi:10.1248/jhs.53.329.

34. Kinoshita S, Inoue Y, Nakama S, Ichiba T, Aniya Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. *Phytomedicine* [Internet]. 2007 Nov [acesso 2016 Abr 8]; 14(11):755-762. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293097>. doi:10.1016/j.phymed.2006.12.012.

35. Online Browsing Platform. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices: part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Washington: Assoc Adv Med Instrum [Internet]. 2009 [acesso xxxx xxx xx]. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>.

36. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, No. 129. Paris: OECD, 2010. (OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, n. 129 - ENV/JM/MONO (2010) 20) [Internet]. [acesso 2016 Abr 07]. Disponível em: <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282010%2920&doclanguage=en>.

37. Nunes PH, Martins MC, Oliveira RC, Chaves, Sousa EA, Leite JR, et al. Gastric

Antitumorogenic and Hypokinetic Activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae). [Internet]. 2014 Maio [acesso em 2016 Mar 15]; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24900960>. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/261745>.

38. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen MJ. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 1999 Oct; 47(10):3954-62. PubMed PMID: 10552749.

39. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agric Food Chem*. [Internet]. 1998 Ago [acesso 2016 Jan 10]; 46(10):4113-4117. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9801973>. doi: 10.1021/jf9801973.

40. Silva MLC, Costa RS, Santana AS, Koblitz MGB. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*. 2010; 31(3):669-682. doi: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n3p669>.

41. Klein JB. Estudo da atividade citotóxica do poliacetileno 5 octa-2,4,6-triil-furan-2(5H)-ona [dissertação]. Itajaí(SC): Universidade do Vale do Itajaí; 2012. Disponível em: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Juliana%20Bagatini%20Klein.pdf>.

42. Chabner BA, Roberts TG Jr. Timeline: chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan; 5(1):65-72. PubMed PMID: 15630416.

43. Nakayama K. Growth and progression of melanoma and non-melanoma skin cancers regulated by ubiquitination. *Pigment Cell Melanoma Res* [Internet]. 2010 Jun [acesso 2016 Abr 7]; 23(3):338-351. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-148X.2010.00692.x/pdf>.

44. Veronez LC. Atividade da fosfoetanolamina sintética em melanoma murino experimental. [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP; 2012. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&q=Atividade+da+fosfoetanolamina+sint%C3%A9tica+em+m+elanoma+murino+experimental&btnG=&lr=>.

45. Instituto Nacional de Cancer. Câncer de pele melanoma. Rio de Janeiro: INCA; 2016 [acesso 2015 Dez. 20]. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma.

46. Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer* [Internet]. 2007 Fev [acesso 2016 Abr 7]; 109(3):6455-64. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.22427/pdf>. doi: 10.1002/cncr.22427. PubMed PMID: 17200963.

47. Jilaveanu LB, Aziz SA, Kluger HM. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work? *Clin Dermatol*. 2009 Nov-Dez; 27(6):614-25. doi: 10.1016/j.clindermatol.2008.09.020. PubMed PMID 19880049.

48. Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, et al. Sentinel Node Biopsy for Early-Stage Melanoma- Accuracy and Morbidity in MSLT-1, an International Multicenter Trial, *Ann Surg*. 2005 Set; 242(3):302-313. PubMed PMID: 16135917. PMID: PMC1357739.

49. Instituto Nacional de Cancer. Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2014 [acesso 2015 Dez 20]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Estimativa_2014.pdf.

50. Ireland A, Millward M, Pearce R, Lee M, Ziman M. Genetic factors in metastatic progression of cutaneous melanoma: the future role of circulating melanoma cells in prognosis and management. *Clin Exp Metastasis*. 2011 Abr; 28(4):327-36. doi: 10.1007/s10585-010-9368-2. PubMed PMID: 21311956.

Como citar este artigo/How to cite this article:

Rodrigues PSM, Bertolin AO, Fucase TM, Galluzzi FM, Marumo HB, Silva EC. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos da casca e das folhas da *Terminalia fagifolia* Mart. sobre células normais e tumorais. *J Health Biol Sci*. 2017 Jan-Mar; 5(1):16-23.