

individuais com fita métrica, dos 10 componentes de cada amostra considerada nas áreas demarcadas, durante os quatro meses de observação. No momento do transplante, em cada área foram denotados grupos A1G1, uma amostra composta de 10 mudas que apresentavam altura inicial entre 45-47 cm, e A1G2, uma amostra com 10 mudas que apresentavam altura inicial entre 47-49 cm, igual denotação foi dada para as áreas A2, A3 e A4 (Tabela 1).

Referências

- ¹ Fernandes A. Temas Fitogeográficos. Stylus comunicações. 1990; 116: Cap.II: Conjunto Vegetacional Cearense
- ² Souza MP, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. 1991; 198
- ³ Matos, FJA. Plantas medicinais brasileiras: um desafio para nossos químicos orgânicos. Desafio. 1990; 3:5-13
- ⁴ Jellinek, I. Alfa-bisabololun agent antiinflammatoire pour produits cosmetique. Aromes. 1984; 57:55-7
- ⁵ Craveiro AA, Alencar JW, Matos FJA. *Vanillosmopsis arborea* Baker. A New Source of (-)-Bisabolol. J.Nat.Prod., Lloydia. 1984; 47: 5 : 747-746

Atividade antineoplásica e tripanocida de *Hovenia dulcis* Thunb. cultivada *in vivo* e *in vitro*

Tatiana Carvalho de Castro^{1*}; Victor Leonardo Bastos Pelliccione¹; Maria Raquel Figueiredo²; Renata Oliveira de Araújo Soares³; Marcelo T. Bozza³; Vera Regina Campos Viana; Norma Albarello¹; Solange Faria Lua Figueiredo¹

¹ Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN), DBAV IBRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

² Laboratório de Química de Produtos Naturais, FIOCRUZ, Far-Manguinhos

³ Laboratório de Farmacologia Aplicada I, FIOCRUZ, Far-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
labplan@uerj.br

Resumo

Muitas são as substâncias do metabolismo vegetal que têm despertado grande interesse, principalmente no setor de fármacos. No presente estudo, foram avaliadas as atividades antineoplásica e tripanocida de extratos vegetais de *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae) cultivada sob condições *in vivo* e *in vitro*. Extratos metanólicos das folhas de material jovem desenvolvido *in vivo* e *in vitro*, exibiram altas porcentagens na inibição do crescimento de todas as linhagens de células tumorais testadas, enquanto extratos etanólicos do pseudofruto mostraram seletividade com elevado percentual de inibição do crescimento celular nas linhagens SP2/0 e BW. Quanto à atividade tripanocida, os extratos aquoso do pseudofruto e metanólico das folhas das plantas germinadas *in vivo*, apresentaram percentual de inibição em 48 h, de 95% e 100%, respectivamente.

Abstract

Plants produce a wide range of secondary metabolites, many of which are pharmaceutically important. In this paper were evaluated anti-cancer and trypanocidal activities from *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae) *in vivo* and *in vitro* propagated plants. Methanolic extracts of young leaves from *in vivo* and *in vitro* material were remarkably active for all tumor cells lines tested, while ethanolic extracts of pseudofruit showed high degree of selectivity against to SP2/0 and BW cells in culture. Mortality of 95 and 100% (48 h) on *Trypanosoma cruzi* were observed on the aqueous extract of pseudofruit and methanolic extracts of leaves from seedlings.

Hovenia dulcis Thunb. (Rhamnaceae), árvore conhecida como uva-do-japão ou cajueiro-japonês, está incluída na categoria das espécies raras do planeta². Do ponto de vista

etnofarmacológico, é utilizada como diurético, antipirético e para doenças do fígado, asma, bronquite e diarreia^{5,6,7,20}.

Estudos recentes da química e farmacologia de *H. dulcis* têm revelado promissor potencial bioativo para a espécie. De seus pseudofrutos, foram isoladas saponinas triterpênicas que exercem atividade inibitória na liberação de histamina em exsudato de células peritonais de ratos e alguns flavonóides com atividade inibidora do relaxamento muscular e atividade hepatoprotetora^{20,21,22}. Nas folhas, constatou-se a presença de saponinas triterpênicas e alguns glicosídeos com atividade inibidora da percepção do sabor adocicado^{8,9,16,18,19}. Em extratos etanólicos da folha da árvore, metanólico da folha e raiz de plântulas germinadas *in vivo* e de folha de plantas propagadas *in vitro* foi observada atividade antiinflamatória¹¹.

As condições ambientais a que estão submetidas as plantas influenciam a síntese de substâncias bioativas. Através das técnicas de cultura de tecidos vegetais é possível a obtenção de metabólitos, independente da localização geográfica e geológica e da influência de fatores como variações sazonais, climáticas²³ e pragas¹⁴. Além de possibilitar a proliferação de material geneticamente homogêneo, o cultivo *in vitro* permite a manipulação da capacidade biossintética, visando a produção de um determinado metabólito.

O estudo com *H. dulcis* foi incentivado devido ao potencial medicinal da espécie e pela recente constatação das atividades antineoplásica^{10,12,14,17} e tripanocida¹⁵ em outras espécies da família Rhamnaceae. Nesse trabalho são avaliadas a atividade antineoplásica em várias linhagens de células tumorais e a atividade tripanocida para os diferentes órgãos da

espécie provenientes de plantas cultivadas *in situ*, germinadas *in vivo* e propagadas *in vitro*.

No ensaio de proliferação, foi avaliada a capacidade dos extratos em inibir o crescimento de diferentes linhagens de células tumorais, medindo-se a incorporação de sal de tetrazólio MTT às mitocôndrias. Observou-se que os extratos metanólicos de folhas das plantas germinadas *in vivo* e propagadas *in vitro* inibiram o crescimento de todas as linhagens celulares testadas. Estes resultados foram marcadamente diferentes dos observados nos extratos foliares de exemplar arbóreo, que não se mostraram efetivos para as linhagens celulares SP2/0, Neuro-2A, MK2 e P3653 e induziram o crescimento celular das linhagens J774 e do carcinoma de Erlich. Entretanto, esses extratos apresentaram atividade antitumoral bastante significativa em relação à linhagem BW, onde observamos um percentual de 64,50 de inibição pelo extrato etanólico e 73,80 pelo metanólico. No extrato etanólico do pseudofruto, podemos observar uma seletividade, com elevado percentual de inibição do crescimento celular (91,87 e 80,00), nas linhagens SP2/0 e BW, no entanto, esse extrato induziu o crescimento celular das linhagens J774 e do carcinoma de Erlich. Em contraste, os extratos de folha e raiz das plantas germinadas *in vivo* e de folha de plantas propagadas *in vitro* mostram uma ampla porcentagem de inibição do crescimento nas linhagens testadas. Desse modo, os resultados confirmam que a espécie possui um grande potencial bioativo, concentrado principalmente para a linhagem BW nos vários órgãos e extratos. Somente os extratos foliares de plantas jovens cultivadas *in vivo* e *in vitro* foram capazes de inibir o crescimento da linhagem MK2 (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antineoplásica de diferentes órgãos dos espécimes de *Hovenia dulcis*

Origem	Órgão	Extrato	Atividade das Linhagens Celulares Tumorais (%)						
			J774	SP2/0	Neuro	MK2	Erlich	BW	P3653
Árvore	PS	aquoso	ICC	NEG	NEG	NEG	ICC	NEG	NEG
Árvore	PS	etanólico	ICC	91,87	NEG	NEG	ICC	80,00	37,14
Árvore	PS	metanólico	NEG	ICC	30,30	NEG	NEG	36,30	ICC
Árvore	folha	etanólico	ICC	NEG	NEG	NEG	ICC	64,50	NEG
Árvore	folha	metanólico	ICC	NEG	NEG	NEG	ICC	73,80	NEG
PG	folha	metanólico	74,80	74,00	86,32	85,67	81,51	92,40	86,25
PG	raiz	metanólico	61,83	72,59	66,81	NEG	50,10	90,70	ICC
PP	folha	metanólico	76,79	90,90	90,36	55,56	83,38	93,20	89,29

ICC - Extratos que induziram o crescimento celular

NEG - Extratos incapazes de inibir o crescimento celular

PS - Pseudofruto

PG - Plantas germinadas *in vivo*

PP - Plantas propagadas *in vitro*

Quanto à atividade tripanocida, os extratos aquosos do pseudofruto e metanólico das folhas de plantas germinadas *in vivo* foram ativos frente ao parasito *Trypanosoma cruzi* da cepa Y. Esses extratos apresentaram um percentual de inibição em 48 h de 95% e 100%, respectivamente.

Nessa investigação, os resultados indicam que plantas jovens germinadas *in vivo* e propagadas *in vitro* de *Hovenia dulcis* possibilitam um aumento potencial da inibição do crescimento nas linhagens tumorais estudadas. Além disso, o extrato das folhas de plantas germinadas *in vivo* e do

pseudofruto mostraram-se capazes de induzir, de forma significativa, a morte parasitária.

Material e Métodos

Material Botânico: Para o processamento de extratos, foram coletados a partir do exemplar arbóreo de *H. dulcis* localizado no município de Teresópolis (RJ), folhas e pseudofrutos acastanhados, correspondentes à fase de maturação, e frutos a eles aderidos. Uma amostra representativa dessa espécie está depositada no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob o número de registro HRJ 1426.

Germinação: As sementes foram germinadas sob condições *in* NaOCl e lavagens sucessivas em água estéril sob condições assépticas, foram inoculados em meio de Murashige & Skoog 13 sem reguladores de crescimento. As culturas foram mantidas a 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 h ($50 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$, lâmpadas fluorescentes branca e Gro-lux) e umidade relativa de $55 \pm 5\%$. Mensalmente os brotos com comprimento igual ou superior a 0,8 cm foram individualizados e subcultivados em meio de mesma composição. Dos brotos alongados e enraizados, com 3 meses em cultura, foram obtidas as demais amostras para a extração.

Extração: As folhas, pseudofrutos e raízes de espécimes das diferentes origens, foram secos à temperatura ambiente, triturados e submetidos à extração com água, etanol ou metanol. Para a obtenção do extrato aquoso, utilizou-se a técnica de infusão. Os frascos vedados permaneceram em temperatura ambiente até o total esfriamento, sendo o material posteriormente filtrado e desidratado em liofilizador, durante 3 dias, obtendo-se ao final uma preparação bruta. Nas extrações metanólicas e etanólicas, as amostras foram imersas em álcool metílico p.a. e álcool etílico p.a. (Merck), respectivamente, durante uma semana, à temperatura ambiente, sob agitação. Os extratos foram filtrados, concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 40 °C e secos sob vácuo até peso constante. Os extratos foram mantidos no escuro a 10 °C.

Ensaio de proliferação *in vitro*: As linhagens de células tumorais usadas foram SP2/0 (mieloma de camundongo), Neuro-2A (neuroblastoma de camundongo), J774 (macrófago de camundongo), P3653 (plasmocitoma de camundongo), BW (timona de camundongo), Erlich (sarcoma induzido por metil colantreno) e MK2 (células epiteliais de rim de macaco). As células foram cultivadas em meio RPMI1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal, gentamicina, piruvato, ácido aminado não essencial, 2-mercapto-etanol e L-glutamina em 96 poços a 37 °C em 5% de CO₂. Depois de 2 h de pré-incubação, 5×10^5 células por poços foram tratadas com os extratos na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em 0,2 ml. As células foram colocadas em solução MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) defenitetrazolium bromide) a uma concentração final de 1 mg/ml por 48 h e depois incubadas por 4 h. Os sobrenadantes foram removidos e 100 μl de DMSO adicionados a todos os poços e posteriormente a densidade óptica medida em leitor de Microelisa em comprimentos

de onda de 630 nm a 490 nm. Os dados foram representados como média \pm SEM das culturas em triplicatas.

Ensaio tripomocida: A linhagem de célula MK2 foi infectada com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* para obtenção das formas tripomastigotas. As células ficaram em cultura a 37 °C em 5% de CO₂ em meio RPMI1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal, gentamicina, piruvato, ácido aminado não essencial, 2-mercapto-etanol e L-glutamina. O sobrenadante da cultura de células foi centrifugado a 700xg por 15 min, coletado e centrifugado novamente a 2000xg por 30 min. Formas tripomastigotas foram contadas em hemocítmetro e o número ajustado para 10^6 parasitas/ml em RPMI1640 e finalmente distribuídos em placas de 96 poços. As amostras foram diluídas em meio RPMI na concentração de 250 $\mu\text{g}/5 \times 10^3$ de parasitas nas formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Todos os ensaios continham um controle negativo e um controle positivo de cristal violeta a 0,2%. Após 48 h de incubação o número de parasitas foi contado em hemocítmetro. Os dados são representados com a média \pm SEM das culturas em triplicatas. O percentual de mortalidade foi determinado após incubação de 24 h e 48 h por comparação com os controles negativo e positivo (meio de cultura e cristal violeta, respectivamente)³.

Referências

- 1 Baísa AM, Quiroz A, Ruíz, JA, Maldonado-Mendonza I, Loyola-Vargas VM. Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1998; 54:123-130
- 2 Bastos NR. A Família Rhamnaceae R. Br. no Rio Grande do Sul. Gêneros: *Colubrina* Rich. ex Brongn., *Gouania* Jacq. e *Hovenia* Thunb. *Pesquisa Botânica*. 1990; 41:99-121
- 3 Boechat N, Carvalho AS, Fernandez-Ferreira E, Soare ROA, Souza AS, Gibaldi D, Bozza MT, Pinto AC. Novel Nitoimidazoles With Trypanocidal And Cell Growth Inhibition Activities. *Cytobios*. 2001; 105:83-90
- 4 Bongaerts RJM. The chorismate branching point in *Catharanthus roseus*. Aspects of anthranilate synthase regulation in relation to indole alkaloid biosynthesis. Thesis (Ph.D.) Universiteit Leiden. 1998
- 5 Corrêa MP. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Imprensa Nacional. 1984; 1-5
- 6 Hussain RA, Lin Y, Poveda LJ, Bordas E, Chung BS, Pezzuto JM, Soejarto DD, Kinghorn D. Plant-derived sweetening agents: saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. *Journal Ethnopharmacology*. 1990; 28(1):103-115
- 7 Kennedy LM, Saul LR, Sefceka R, Stevens DA. Hodulcin: selective sweetness-reducing principle from *Hovenia dulcis* leaves. *Chemical Senses*. 1988; 13:529-543
- 8 Kimura Y, Kobayashi Y, Takeda Y, Ogihara Y. Three new saponins from the leaves of *Hovenia dulcis*. *Journal Chemical Society Perkin Trans. I*. 1981; 1981:1923-1927

- ⁹Kobayashi Y, Takeda T, Ogihara Y, Litaka Y. Novel dammarane triterpenoid glycosides from the leaves of *Hovenia dulcis*. X-Ray crystal structure of hovenolactone monohydrate. Journal Chemical Society Perkin Trans. I. 1982; 2795-2799
- ¹⁰Lisková D, Ordóñez JR, Lux A, López AP. Tissue culture of *Karwinskia humbolditiana* - a plant producing toxins with antitumoural effects. Plant Cell Tissue Organ Culture. 1994; 36:339-343
- ¹¹Malaquias FS, Carvalho TM, Oliveira EF, Pelliccione VLB, Gianfaldoni MG, Figueiredo MR, Henriques MGMO, Rosas EC, Viana VRC, Albarello N, Figueiredo SFL. Atividade antiinflamatória de *Cleome spinosa* e *Hovenia dulcis* cultivadas *in situ* e *in vitro*. In: Resumos da XXII Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares. Rio de Janeiro, UFF. 2000; P-09
- ¹²Martínez FJ, Durón RR, Torres NW, Piñeyro-López A. Experimental evidence for toxic damage induced by a dimeric anthracenone: diast T-514 (peroxisomicine A₂). Toxicology Letters. 1997; 90:152-162
- ¹³Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 1962; 15:473-497
- ¹⁴Popoca J, Aguilar A, Alonso D, Villarrea ML. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. Journal Ethnopharmacology. 1998; 59:173-177
- ¹⁵Rosas LV, Campos FR, Nascimento SKR, Januário AH, Pereira PS, França SC, Cordeiro MSC, Toldo MPA, Albuquerque S. Avaliação da atividade tripanomicida de extratos de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (Rhamnaceae). In: Resumos da IV Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. Ribeirão Preto, UNAERP. 1999; pag.88
- ¹⁶Suttisri R, Lee I, Kinghorn AD. Plant-derived triterpenoid sweetness inhibitors. Journal Ethnopharmacology 1995; 47(1):9-26
- ¹⁷Waksman N, Benevides-Cortez G, Rivas-Galindo V. Biologically active anthracenones from roots of *Karwinskia parvifolia*. Phytochemistry. 1999; 50:1041-1046
- ¹⁸Yoshikawa K, Tumura S, Yamada K, Arihara S. Antisweet natural products: VII. Hodulosides I, II, III e IV, and V from the leaves of *Hovenia dulcis* Thunb. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 1992; 40(9):2287-2291
- ¹⁹Yoshikawa K, Nagai Y, Yoshida M, Arihara S. Antisweet natural products. VIII. Structures of hodulosides VI-X from *Hovenia dulcis* Thunb. var. *tomentella* Makino. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 1993; 41(10):1722-1725
- ²⁰Yoshikawa M, Ueda T, Muraoka O, Aoyama H, Matsuda H, Shimoda H, Yamahara J, Murakami N. Absolute stereostructures of hovenidulciosides A₁ and A₂, bioactive novel triterpene glycosides from hoveniae semen seu fructus, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 1995; 43(3):532-534
- ²¹Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N. Bioactive saponins and glycosides. IV. Four methyl-migrated 16,17-seco-dammarane triterpene glycosides from chinese natural medicine, hoveniae semen seu fructus, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb.: Absolute stereostructures and inhibitory activity on histamine release of hovenidulciosides A₁, A₂, B₁, and B₂. Chemical Pharmaceutical Bulletin. 1996; 44(9):1736-1743
- ²²Yoshikawa M, Murakami T, Ueda T, Yoshizumi S, Ninomiya K, Murakami N, Matsuda H, Saito M, Fujii W, Tanaka T, Yamahara J. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I, II and III, isolated from hoveniae semen seu fructus, the seed and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae): inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepaprotective activity. Yakugaku Zasshi. 1997; 117(2):108-118
- ²³Yoshimatsu K, Kazuya A, Shimomura K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha* (II): Characteristics of regenerated plants field-cultivated in two districts. Journal Plant Physiology. 1994; 144:22-25