

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E CITOTÓXICA DO EXTRATO AQUOSO DE *CONYZA BONARIENSIS* (L.) CRONQUIST

Altevir Rossato Viana¹
Francielle Liz Monteiro¹
Henrique Ataíde Isaia¹
Eliza Beti de Cássia Stefanon¹
Luiz Filipe Machado Garcia²
Michele Rorato Sagrillo^{1,2}

RESUMO

A citotoxicidade significa causar efeito tóxico a nível celular, podendo ser por morte celular, alterações na permeabilidade da membrana e inibição enzimática. A ocorrência da apoptose e, conseqüente, diminuição da proliferação celular pode ser desencadeada por vários fatores. A *Conyza bonariensis* pertencente à família Asteraceae é uma planta nativa da América do Sul, conhecida principalmente como buva. Este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antiproliferativa e citotóxica do extrato aquoso de *Conyza bonariensis* (L.) pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em um produto com a coloração azul escuro (MTT-formazan) pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase. A buva apresentou atividade antiproliferativa e citotóxica nas concentrações de 5 e 5000 µg/mL, com a diminuição da proliferação celular de 25,70% e 37,04%, indicando seu potencial terapêutico para inibição do ciclo celular. As demais concentrações (25; 50; 100; 500 e 1000 µg/mL) não apresentaram diferença significativa com relação ao controle.

Palavras-chave: *Conyza bonariensis*, buva, citotoxicidade, antiproliferativo, MTT.

¹ Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, RS.

² Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. rossato.viana@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A citotoxicidade significa causar efeito tóxico a nível celular. O efeito tóxico pode ser a morte celular, alterações na permeabilidade da membrana e inibição enzimática. O mecanismo de apoptose ou “morte programada” é um processo celular fisiológico normal que ocorre por diferentes situações em que a célula é exposta, como por exemplo, na organogênese e hematopoese normal e patológica, na reposição fisiológica de determinados tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos. A ocorrência da apoptose pode ser desencadeada por vários fatores sendo eles: níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (ROS), baixa quantidade de nutrientes à célula, privação de fatores de crescimento, choque térmico, radiação ionizante, danos ao DNA, agentes quimioterápicos e ligação de moléculas a receptores de membrana (MONTAGNER, 2010). A cultura de células é uma ferramenta valiosa para a investigação do funcionamento celular, pois consiste na manutenção e multiplicação *in vitro* de células vivas possibilitando a análise do metabolismo e do comportamento celular frente a um componente a ser testado. Através da cultura é possível identificar os mecanismos envolvidos na regulação, síntese e destino de produtos celulares como proteínas, componentes da matriz extracelular além da influência de agentes externos na biologia das células como, fatores de crescimento e substâncias tóxicas, além de informações genéticas (LUISI, 2006). A *Conyza bonariensis* (L.) pertencente à família Asteraceae é conhecida popularmente como buva, margaridinha-do-campo ou voadeira. É uma espécie nativa da América do Sul que ocorre na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil. Produz grande quantidade de sementes, as quais apresentam características de fácil dispersão, caracterizando a espécie como agressiva. No Rio Grande do Sul, apresenta-se como importante planta daninha infestante de lavouras de trigo, soja e milho (LORENZI, 2000). Na medicina popular, é utilizada para tratar reumatismo, gota, cistite, nefrites, dor de dente, dor de cabeça, úlceras estomacais, digestiva, diurética, leucemia, anemia e

na forma de infuso de diversas partes da planta, como anti-séptico, anti-ulcerativo e hepatoprotetor (ASONGALEM *et al.*, 2004). Apesar de sua utilização como planta medicinal, foram encontradas poucas informações sobre a buva, fundamentando-se, assim, a realização dessa pesquisa. Este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antiproliferativa e citotóxica do extrato aquoso de *Conyza bonariensis* (L.) pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em um produto com a coloração azul escuro (MTT-formazan) pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase.

MÉTODOS

A *Conyza bonariensis* (L.) foi colhida nos meses de novembro e dezembro na cidade de Cruz Alta (RS). A planta foi triturada e o pó obtido foi homogeneizado em água destilada e aquecido por 30 minutos à 72°C. O material foi filtrado e liofilizado a -18°C e 13,3 Pa. Armazenou-se o extrato liofilizado em frasco âmbar a -18°C até sua utilização. A atividade citotóxica foi avaliada pelo método colorimétrico proposto por Mosman (1983), cujo princípio baseia-se na redução MTT em um produto com a coloração azul escuro (MTT-formazan) pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase. A conversão ocorre somente em células viáveis e a quantidade do produto MTT-formazan é proporcional ao número de células vivas presentes (MIZUNO *et al.*, 2000). As células foram obtidas a partir da técnica de separação de células mononucleares. Em um tubo cônico adicionou-se 7mL de histopaque e 7mL de sangue heparinizado. Assim, o tubo foi centrifugado durante 30 minutos a 1450 RPM. As células mononucleares foram retiradas com uma pipeta de vidro e transferidas para outro tubo cônico, na qual adicionou-se 10mL de meio RPMI. Em seguida, centrifugou-se por 10 minutos a 1150 RPM e o sobrenadante foi desprezado por inversão. O pellet de células mononucleares foi ressuscitado em meio RPMI com soro fetal bovino (SFB). Retirou-se uma alíquota de 10µL que foi misturada a 10µL de tripan, para a realização da contagem de células em câmara de Neubauer. A média de células dos quadrantes foi multipli-

cada pelo fator de diluição do Azul de Tripán (2) e por 10^4 (constante), na qual o resultado obtido foi de $2,78.10^6$ células em $1000\mu\text{L}$. Como a quantidade de células desejada por poço é de 2.10^5 , o volume pipetado em cada poço da placa de ELISA foi de $72\mu\text{L}$. O extrato bruto da *Conyza bonariensis* (L.) foi separado em sete concentrações: 5, 25, 50, 100, 500, 1000 e $5000\mu\text{g/mL}$, partindo de uma concentração inicial de $20000\mu\text{g/mL}$ e realizando diluições seriadas da maior concentração para a menor. O extrato foi diluído em meio RPMI com SFB, para obtenção de um volume final de $240\mu\text{L}$. Nos controles positivo e negativo, foram adicionados $72\mu\text{L}$ de células e meio RPMI com SFB, sendo que, no controle positivo, foi adicionado $2\mu\text{L}$ de fitohemaglutinina (PHA). O experimento foi realizado em triplicata. A placa de ELISA foi deixada por 120 horas em estufa à 37°C com 5% de CO_2 . Após 5 dias, foi realizado o ensaio colorimétrico para avaliação da citotoxicidade do extrato. O MTT foi dissolvido em PBS (0,01M; pH 7,4) a 5mg/mL e, desta solução, $20\mu\text{L}$ foram adicionados em cada poço. A placa foi colocada em um shaker durante 5 minutos (150RPM) e incubada durante 4 horas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Após este período, o sobrenadante foi retirado dos poços, deixan-

do somente as células, as quais foram ressuspensas em $200\mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO) e novamente, a placa foi colocada em um shaker durante 5 minutos (150RPM). Logo após, determinou-se a absorvância em leitora de ELISA em comprimento de onda de 560nm . Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente no programa SPSS, sendo comparados por análise de variância de uma e duas vias, seguida de teste *post hoc* de Duncan.

RESULTADOS

Os resultados da atividade citotóxica estão representados na Figura 1. Os tratamentos contendo extrato a 5 e $5000\mu\text{g/mL}$ demonstraram uma diminuição da proliferação celular de 25,70% e 37,04%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). As demais concentrações (25; 50; 100; 500 e $1000\mu\text{g/mL}$) não apresentaram diferença significativa com relação ao controle. Já o tratamento realizado com a Fitohemaglutinina, demonstrou um aumento da proliferação celular de aproximadamente 2,4 vezes maior, quando comparado ao grupo controle.

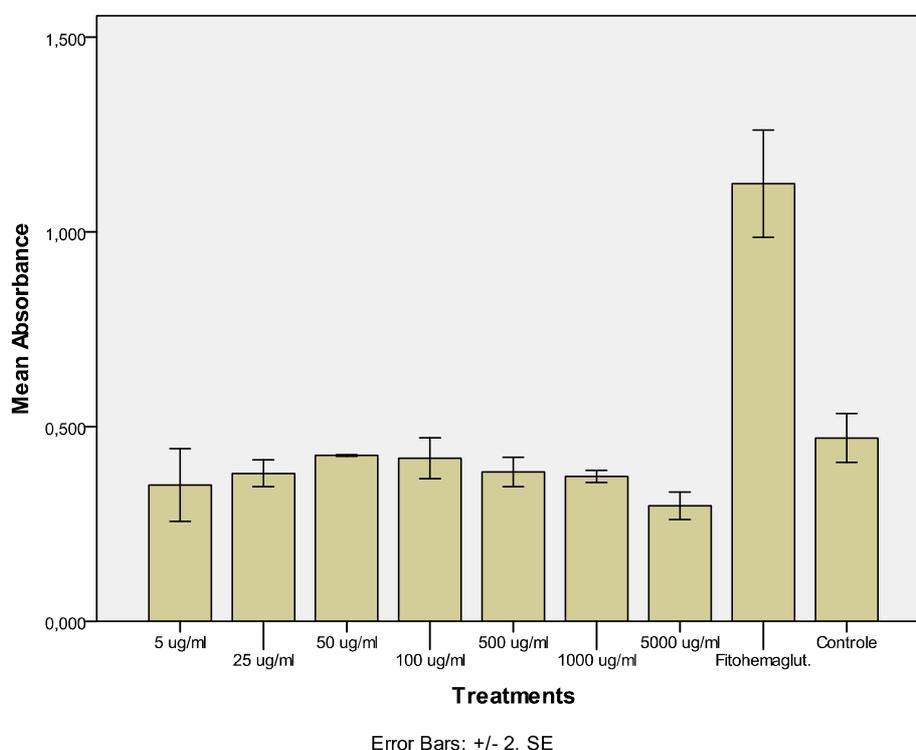


Figura 1 – Média das absorvâncias em função dos tratamentos com o extrato aquoso de *Conyza bonariensis* (L.)

DISCUSSÃO

As plantas medicinais são muito utilizadas na medicina popular, sendo algumas vezes, a única fonte de medicação que a população tem acesso. Entre as plantas com potencial medicinal, estão as espécies da família Asteraceae, como *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* nativas no sul do Brasil. Apesar da família Asteraceae, compreender algumas das mais antigas e mais valorizadas plantas medicinais, diferentes gêneros desta família apresentam compostos tóxicos como ácidos tanínicos, hidrociânicos, fórmicos e málicos, rutina e furfural. É importante salientar que o papel histórico das ervas medicinais no tratamento e prevenção de doenças e seu papel como catalizadoras no desenvolvimento de farmacologia não mantém sua segurança para o uso ilimitado pelo público sem informação (DUKE, 2000). Através de nossos resultados, é possível verificar a presença de atividade antiproliferativa e citotóxica desta espécie, indicando seu potencial terapêutico para inibição do ciclo celular. Neste estudo, o extrato aquoso da planta apresentou inibição da divisão celular já na menor concentração usual, indicando a ocorrência de atividade antiproliferativa do extrato. Esses resultados estão em acordo com os estudos realizados por Faschinetto e Tedesco (2009), que avaliaram os extratos aquosos da espécie *Baccharis trimera*, da mesma família da planta estudada através do sistema teste vegetal de *Allium cepa* e teste de linfócitos de sangue periférico humano. Estes autores observaram atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos nas concentrações de 20 mg/mL e 200 mg/mL, sendo encontrados nos dois estudos atividade antiproliferativa semelhantes às obtidas neste trabalho. Estes resultados reforçam a importância de mais estudos sobre a planta já que o mesmo apresenta resultados similares aos obtidos com outros sistemas testes. Segundo Fikejö (1994), testes de genotoxicidade devem ser realizados quando a atividade antiproliferativa se mostra tão eficiente em concentrações baixas, pois fornece excelente parâmetro de análise citotóxica, além da observação da ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular usada como indicativo para prevenir a popula-

ção humana sobre o consumo do produto. De acordo com Craag & Newman (2005), muitos dos agentes utilizados na terapia do câncer são derivados de fontes naturais e foram descobertos a partir de testes de citotoxicidade, por inibirem a proliferação de células cancerosas em modelos *in vitro* ou *in vivo*.

CONCLUSÕES

A *Conyza bonariensis* (L.) apresentou atividade antiproliferativa e citotóxica nas concentrações de 5 e 5000 µg/mL, indicando seu potencial terapêutico para inibição do ciclo celular. Mais estudos serão necessários para estabelecer a utilização segura desta planta pela população, pois não há na literatura referências desta propriedade sobre a espécie estudada.

REFERÊNCIAS

- ASONGALEM, EMMANUEL. A.; FOYET, HARQUIN S.; NGOGANG, JEANNE Y.; FOLEFOC, GABRIEL N.; DIMO, THÉOPHILE; KAMTCHOING, PIERRE. Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 301-308, 2004.
- CRAAG, GORDON M.; NEWMAN, DAVID J. Plants as source of anticancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-9, 2005.
- DUKE, JAMES A. Toxins: their toxicity and distribution in plant genera. In: _____. **Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC Press, p. 525-68, 2000.
- FASCHINETTO, TEDESCO. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 11, p. 360-367, 2009.
- FIKEJÖ, GEIRID. *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 9, p. 235-41, 1994.

LORENZI, HARRI. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais.** São Paulo. Editora Instituto Plantarum, p. 608, 2000.

LUIZI, SIMONE B. **Comportamento de células pulpares humanas expostas ao TGF β 1 e ao α FGF em cultura.** Tese de Doutorado em Patologia Bucal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 6 de julho de 2006.

MIZUNO, MASASHI; SHIOMI, YOICHI; MINATO, KEN-ICHIRO; KAWAKAMI, SACHIKO; ASHIDA, HITOSHI; TSUCHIDA, HIRONOBU. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 113-121, 2000.

MONTAGNER, GREICE F. F. dos S. **Efeito *in vitro* do polimorfismo ALA16VAL do gene da superóxido dismutase dependente de manganês no metabolismo oxidativo de linfócitos.** Dissertação de Mestrado em Bioquímica Toxicológica. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 5 de março de 2010.

MOSMAN, TIM. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

