



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

EXTRATO DE FRUTO DO ARATICUM (*ANNONA CRASSIFLORA*) PROMOVE A MORTE CELULAR E REDUZ A INVASIVIDADE DE CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

Autores: AMANDA MARIA RIBEIRO FREITAS, UGO BORGES PINHEIRO, ROGÉRIO GONÇALVES DA ROCHA, FELIPE ALBERTO DANTAS GUIMARÃES, GERALDO ACLÉCIO MELO, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, LUCYANA CORNCEIÇÃO FARIAS

Introdução

O Araticum (*Annona crassiflora*) é um fruto típico do cerrado brasileiro e ocorre na região do norte de Minas Gerais (EGYDIO, 2013). Algumas análises fitoquímicas foram realizadas com a polpa do fruto e resultaram na identificação de substâncias bioativas isoladas a partir do extrato orgânico. Essas substâncias apresentaram atividade anti-oxidante (BRAGA FILHO, 2014), demonstrando o potencial terapêutico dessa espécie (ROESLER, 2011).

Os efeitos do extrato bruto, assim como as frações do Araticum sobre o fenótipo das células do carcinoma epidermoide de boca (CEB), ainda não são conhecidos.

Assim, este estudo teve por objetivo avaliar o potencial antineoplásico de frações do Araticum sobre comportamento *in vitro* de células de CEB, com ênfase na morte e invasividade celular.

Material e métodos

A. Preparação dos extratos

O fruto *Annona crassiflora* foi colhido na região do cerrado na cidade de Montes Claros, e foi feita identificação da espécie por taxonomista. A polpa do fruto foi separada e, posteriormente, liofilizada. O produto liofilizado foi triturado, pesado e submerso em etanol 99% em recipientes de vidro âmbar, conservados em local escuro e seco por 10 dias. Após esse período, o extrato foi reduzido no rotaevaporador. Posteriormente, foi realizada a filtração em funil de vidro, com papel de filtro qualitativo. O extrato bruto foi levado à estufa de circulação forçada de ar a $40^{\circ}\text{C} \pm 5$ até a completa evaporação do solvente.

B. Fracionamento do extrato bruto

Para o fracionamento do extrato bruto, este passou por ciclos em diferentes solventes na seguinte ordem: Hexano, diclorometano, Acetato de Etila e Butanol, objetivando separar as moléculas com diferentes polaridades. Foi colocado 1g. de extrato bruto em um recipiente para maceração com o primeiro solvente (30 ml de Hexano) e macerado por 10 minutos. Após esse tempo, o sobrenadante foi colocado em uma placa de vidro. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes atingindo 90 ml de sobrenadante. O sobrenadante foi acondicionado em placa de vidro e colocado na estufa de secagem e circulação à 40 graus para evaporação. O mesmo procedimento usado para o solvente Hexano foi usado também para os outros solventes usando a mesma massa de extrato bruto. Cada fração foi deixada para desidratar por 24h. Depois desse período, foi feita a raspagem das placas de vidro para pesar a fração desidratada em tubos tipo eppendorf.

C. Diluição da fração para ensaios fenotípicos

As frações foram diluídas no veículo DMSO e posteriormente em meio de cultura DMEM/F12 (Gibco, USA), obtendo-se as concentrações 10ug/ml e 100ug/ml. As concentrações foram obtidas a partir da diluição seriada da solução estoque em DMSO 100%, sendo que a concentração do veículo, em cada diluição, foi inferior a 0,1%, visando evitar a toxicidade das células pelo DMSO.

D. Cultivo celular

Células da linhagem celular imortalizadas de CEB, SCC-9 (ATCC Cell Bank, USA), foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 contendo 10% de soro fetal bovino, 400ng/ml de hidrocortisona e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco, USA), mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO₂. Tal linhagem foi tratada com a fração butanol do fruto, nas concentrações 10ug/ml e 100ug/ml, durante 24h. Tal fração foi selecionada para teste em relação às demais, por apresentar maior solubilidade no veículo DMSO. Anteriormente, foi realizada uma curva dose-resposta para estabelecer a concentração da fração e o tempo de tratamento.



CIÊNCIA E TECNOLOGIA:
IMPLICAÇÕES NO ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO

FEPEG

F Ó R U M
ENSINO • PESQUISA • EXTENSÃO • GESTÃO

REALIZAÇÃO:



APOIO:



ISSN: 1806-549X

E. Ensaio de morte celular

Após os tratamentos experimentais, as células foram coradas com brometo de etídio (BE) e alaranjado de acridina (AA) (Sigma Aldrich, USA). BE emite fluorescência vermelha em células mortas; AA emite fluorescência verde em células viáveis. As células foram observadas num microscópio de fluorescência FSX100. Foi realizada a contagem das células mortas e vivas, estabelecendo a razão entre células mortas e células totais, em porcentagem.

F. Ensaio de migração

Uma densidade de 8×10^4 células de CEB foi incubada em placas de 12 poços, a 37°C , 5% de CO_2 , durante 24 horas. Em seguida, foram carenciadas com meio de cultura livre de soro. Antes do tratamento das células com a fração butanol, utilizando uma ponteira de 200 μl , foi criada uma área livre de células, para analisar a capacidade de migração das células submetidas ao tratamento (CHAN, S. W. *et al.*, 2008). O meio de cultura foi então substituído por meio isento de soro, adicionando, em poços separados, as concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ da fração butanol. Foram adotados os controles 1 e 2 para as análises. Para mensurar a área coberta por células migratórias, as imagens das monocamadas de células foram realizadas usando um Microscópio Invertido Olympus IX81 (Olympus, CenterValley, PA, EUA), acoplado com a câmera SC30 (Olympus) a 0 e 72 h.

G. Análises estatísticas

Os resultados foram tabulados e analisados no software estatístico SPSS®, versão 18.0, para Windows. Foi utilizado o teste Anova One-Way, com nível de significância $p < 0,05$.

Resultados e discussão

A. Fração butanol do Araticum favoreceu a morte de células de CEB

O grupo tratado com 100 $\mu\text{g/mL}$ da fração butanol apresentou maior frequência de morte celular, estatisticamente significativa, em relação aos outros grupos controles e tratados com 10 $\mu\text{g/mL}$ da fração butanol (Fig. 1A).

B. A fração butanol do Araticum reduziu a migração de células de CEB

A migração das células SCC-9 apresentou uma diminuição estatisticamente significativa nos grupos tratados com a fração butanol do Araticum 100 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado com seus respectivos controles (Fig. 1B). Tais resultados apontaram para um efeito antineoplásico potencial de substâncias presentes no fruto do Araticum, exercendo uma modulação do fenótipo neoplásico.

Considerações finais

O estudo mostrou evidências iniciais da ação antineoplásica do fruto do Araticum sobre o comportamento fenotípico de células de carcinoma epidermoide de boca. A fração butanol do Araticum interferiu na migração e morte celular. Análises experimentais de modelos de estudo *in vivo* e ensaios moleculares necessitam ser realizados a fim de corroborar tais resultados. Além disso, as perspectivas para esse estudo, envolve a identificação dos possíveis compostos bioativos presentes no fruto.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brasil. Os autores também agradecem à Universidade Estadual de Montes Claros.

Referências bibliográficas

EGYDIO, A.P.M.; VALVASSOURA, T.A.; SANTOS, D.Y.A.C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annonacassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46, 145–151, 2013.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(1), 93-100, 2011.

BRAGA-FILHO, J.R.; NAVES, R.V.; CHAVES, L.J.; PIRES, L.L.; MAZON, L.T. Caracterização física e físico-química de frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). *Bioscience Journal*, 30(1), 16-24, 2014.

CORRÊA, S.C.; CLERICI, M.T.P.S.; GARCIA, J. S.; FERREIRA, E. B.; EBERLIN, M.N.; AZEVEDO, L. Evaluation of dehydrated marolo (*Annonacassiflora*) flour and carpels by freeze-drying and convective hot-air drying. *Food Research International*, 44(7), 2385–239, 2011.

COTA, L.G.; VIEIRA, F. A.; MELO JÚNIOR, A. F.; BRANDÃO, M. M. SANTANA, K.N.O.; GUEDES, M.L.; OLIVEIRA, D.A. Genetic diversity of *Annonacassiflora* (Annonaceae) in northern Minas Gerais State. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 2172-2180, 2011.

Chan, S. W. *et al.* A role for taz in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res*, v.68, n.8, p.2592-2598, 2008.

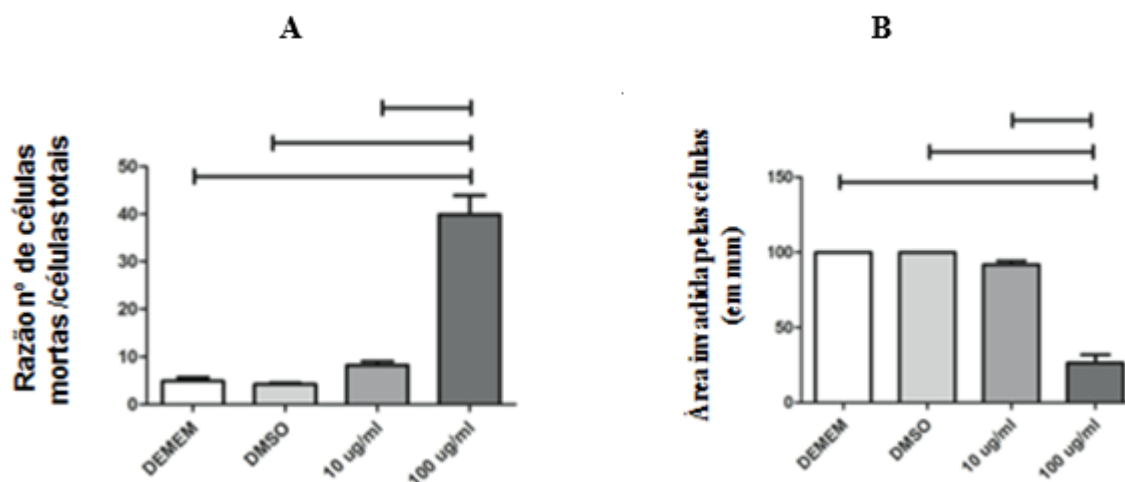


Figura 1. Alterações na morte celular, representada pela razão entre células mortas e células totais (A) e migração, representada pela área invadida pelas células SCC9 tratadas com 10 e 100 µg/mL da fração butanol do Araticum, por 24h. Grupos experimentais: DEMEM (células livres de tratamento, em meio de cultura), DMSO (células livres de tratamento em meio de cultura e veículo de diluição DMSO 0,1%); Grupo 10 µg/mL (células tratadas com 10 µg/mL da fração butanol do Araticum); Grupo 100 µg/mL (células tratadas com 100 µg/mL da fração butanol do Araticum). Teste Anova One-Way; Barras horizontais indicam significância estatística: $p < 0,005$.