

EFEITO DOS COMPOSTOS DE RUTÊNIO E DO EXTRATO BRUTO DA PLANTA *PALICOUREA CORIACEA* NA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE CÉLULAS DE CAMUNDONGOS *IN VITRO*.

Ribeiro, André Luis Thomé¹; Pereira, Nilson Rodrigues¹; Calixto, Sandra²; Pavanin, Luis Alfredo²; Kato, Lucilia³ Silveira-Lacerda, Elisângela de Paula¹.

Palavras-chave: MTT, *P. coriacea*, atividade anti-neoplásica, rutênio

1. INTRODUÇÃO

Na última década os complexos de rutênio adquiriram grande interesse pelo seu potencial como agente antineoplásico. Atualmente vários tipos de rutênio (II) provaram ter atividade antitumoral. Entretanto os complexos de rutênio (III) são os mais estudados. O metal Rutênio (III) possui características químicas favoráveis que indicam que ele seja um forte candidato a formar a base dos agentes antineoplásicos (KEPPLER, 1990). Várias evidências sugerem que complexos de rutênio interagem com proteínas específicas regulando suas atividades biológicas. Sabe-se que o complexo de rutênio vermelho usado tradicionalmente como corante citológico para microscopia eletrônica liga-se a sítios aniônicos de proteínas ligantes de cálcio (SRIVASTAVA et al., 1981)(MACGLILLIVRAY et al., 2000)(CLARKE, 2003).

A espécie *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. (Rubiaceae), é conhecida pela população pelo nome de “douradinha”. Usada na forma de chá das suas folhas, recomendada contra cálculos renais, inflamações de uretra e rins (SILVA et al,2003). Em diversos casos também é utilizada o chá da raiz macerada. O estudo fitoquímico da *Palicourea coriacea*, das folhas e da raiz, apresentou diversos compostos. Um alcalóide quinolínic (calicantina), três alcalóides indólicos monoterpênicos glicosilados(ácido strictosidínico, ácido strictosidínico-4',3" –sacarose, ácido 3-epi-strictosidínico), um triterpeno ursano (ácido ursólico) e três esteróides (β -sitosterol, Estigmasterol, campesterol). Dentre essas substâncias, destacam-se o ácido strictosidínico-4',3" –sacarose e o ácido 3-epi-strictosidínico por serem inéditas, as demais já haviam sido anteriormente isoladas de outras espécies vegetais. (NASCIMENTO, 2005). Este estudo tem como objetivo aperfeiçoar metodologias para avaliação de compostos antitumorais *in vitro*, bem como avaliar a atividade antitumoral de novos compostos de rutênio (III) *cis*- $[RU(C_2O_2)(NH_3)_4]_2$ e substâncias isoladas de plantas do cerrado.

2. METODOLOGIA

2.1-Linhagens de células tumorais de camundongos:

O tumor ascítico de Sarcoma 180 foi proveniente do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia/MG. As células S180 deste tumor foram mantidas em camundongos Swiss por repiques em intervalos de 10 dias por inoculação intraperitoneal (i.p.) de 10⁵ células/0,1mL/camundongo.

2.2-Método Colorimétrico do MTT

Para a avaliação da atividade antitumoral do composto de rutênio, foi utilizado o método colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). O método avalia indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Quando as células estão vivas as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-

(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) levando a quebra dessa molécula e a redução desta formando assim o Azul de Formazan.

2.3-Preparação dos extratos vegetais para teste de atividade anti-tumoral

Os extratos vegetais desse trabalho foram fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG). Foram selecionados para os testes o extrato bruto etanólico da folha de *P. coriacea* (PC-ETOH) e o extrato bruto metanólico da raiz de *P. coriacea* (PC-MEOH). Para o plaqueamento foram pesados 20 mg de ambos os extratos de *P. coriacea*, diluídos em 2 mL de DMSO 0,1%, resultando numa concentração final de 10 mg/ml. Após a diluição o pH foi estabelecido em 7,2. Por fim o extrato foi esterilizado por filtração em filtro milipore 0,22 micra. O processo foi realizado no momento do teste do MTT. Como controle positivo para os extratos foi utilizado a droga metotrexato, solução injetável, na concentração de 25 mg/ml cedido pelo CGO.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Citotoxicidade do extrato bruto de *Palicourea coriacea* sobre macrófagos intraperitoneais de camundongos

Os resultados apresentados na Figura 1 demonstram que o extrato PC-ETOH apresentou atividade citostática sobre os macrófagos somente nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹. Já na atividade citostática sobre os macrófagos do extrato PC-MEOH se observou nas concentrações de 0,625 a 5,0 mg.mL⁻¹.

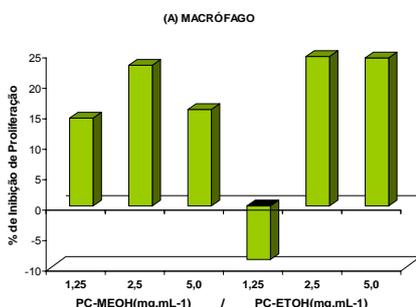


Figura 1 – Atividade citostática dos extratos de *Palicourea coriacea* in vitro sobre macrófagos de camundongos. As células de macrófagos foram encubadas por 24h na presença dos extratos vegetais, PC-ETOH (0,07812 a 5,0 mg.mL⁻¹) e PC-MEOH (0,07812 a 5,0 mg.mL⁻¹), e na presença de cultura (controle). Após 24h o percentual de citotoxicidade foi calculado pelo método colorimétrico do MTT. Os dados mostram a media ± DP de três experimentos independentes. (p<0,05).

3.2-Citotoxicidade do extrato bruto de *Palicourea coriacea* sobre a linhagem tumoral de Sarcoma 180 (S180)

O extrato vegetal PC-ETOH apresentou atividade citostática sobre células do sarcoma 180 nas concentrações de 1,25 e 5,0 mg.mL⁻¹ (figura 2A), sendo ligeiramente superior na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ (coluna verde) em relação ao controle metotrexato (coluna azul). No resultado apresentado pelo extrato PC-MEOH, não foi observada nenhuma atividade citostática sobre as células do sarcoma 180 (figura 2B).

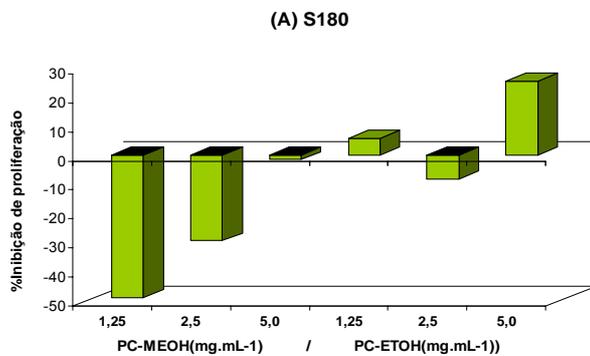


Figura 2 – Efeito antitumoral dos extratos de *Palicourea coriacea* in vitro sobre célula tumoral S180 de camundongo. As células tumorais foram incubadas na presença dos extratos vegetais, PC-ETOH (0,07812 a 5,0 mg.mL⁻¹) e PC-MEOH (0,07812 a 5,0 mg.mL⁻¹) e do Metotrexato (5,0 mg.mL⁻¹). Após 24h o percentual de citotoxicidade foi calculado pelo método colorimétrico do MTT. Os dados mostram a média ± DP de três experimentos independentes. ($p < 0,05$).

3.3-Citotoxicidade do cis-tetraaminoxalatorutênio (III) sobre a linhagem tumoral de Sarcoma 180 (S180)

O composto cis-tetraaminoxalatorutênio (III) apresentou uma atividade citostática sobre as células do sarcoma 180 nas concentrações de 0,02 a 0,4 mg.mL⁻¹ (Figura 3). Comparativamente, observa-se que há uma significativa superioridade na atividade citostática do cis-tetraaminoxalatorutênio (III) em todas as suas concentrações (colunas verdes), em relação ao controle Oxaliplatina (coluna azul).

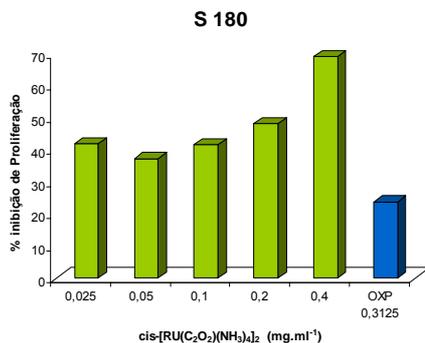


Figura 3 – Efeito antitumoral do composto cis-tetraaminoxalatorutênio (III) in vitro sobre célula tumoral S180 de camundongo. As células tumorais foram incubadas na presença do cis-tetraaminoxalatorutênio (III) (0,02 a 0,4 mg.mL⁻¹) e do Oxaliplatina (0,3125 mg.mL⁻¹). Após 24h o percentual de citotoxicidade foi calculado pelo método colorimétrico do MTT. Os dados mostram a média ± DP de três experimentos independentes. ($p < 0,05$).

No presente trabalho, verificou-se que os extratos vegetais de *Palicourea coriacea*, PC-ETOH e PC-MEOH, apresentam uma baixa atividade citostática sobre as células macrófago de camundongos. O mesmo não ocorreu para a linhagem tumoral de Sarcoma 180, aonde somente o extrato vegetal PC-ETOH, apresentou uma mínima atividade citostática, porém sendo sua atividade superior ao da droga metotrexato. Dados relevantes mostraram que a droga metotrexato possui uma atividade citostática significativa em outras linhagens tumorais (Silveira-Lacerda, 2003), podendo inferir então que com base nos dados deste trabalho a droga metotrexato, nas concentrações

avaliadas não seriam adequadas para a administração contra a linhagem tumoral S180. Em trabalhos anteriores, foi descrito que os extratos da *Palicourea coriacea* apresentaram atividade antibacteriana, aonde os compostos químicos dessa planta seriam mais concentrados na parte da folha, sendo o principal deles o ácido ursólico (Nascimento, 2005). Isso pode explicar a maior proliferação celular verificado no composto PC-ETOH em relação ao PC-MEOH, já que foram retirados de isolados de partes diferentes da planta. Esses compostos estariam auxiliando na proliferação celular ao invés de ser tóxico para a célula. Isso leva há uma hipótese de que esses extratos poderiam, em doses baixas, serem utilizados no auxílio à produção de células em pacientes imunodeficientes.

O composto cis-tetraaminoxalatorutênio (III) apresenta excelente atividade citostática sobre a linhagem tumoral de Sarcoma 180. Em relatos recentes, demonstrou-se que em algumas linhagens tumorais com as células A-20, o cloreto de cis tetraamindiclororutenio (III) em concentrações iguais ou abaixo de 0,1 mg.mL⁻¹ estimulam estas células para a proliferação. Estes dados indicam que para a utilização de compostos para a terapêutica antitumoral seria necessária levar em consideração aspectos sobre o estado de diferenciação ou ativação da célula tumoral. Estes dados abre novos horizontes para investigações sobre complexos de rutênio como uma droga imunoestimulante os quais poderiam ser futuramente utilizados também em doenças onde haja a necessidade de potencializar a imunidade do indivíduo como nas imunodeficiências. A metodologia utilizada neste trabalho permite de forma prática analisar compostos sintéticos ou derivados de produtos naturais com potencial antitumoral e permitem aos químicos uma orientação no sentido de utilizar os melhores métodos de extração de substâncias ou mesmo, orientação para a síntese de compostos mais efetivos quanto à atividade biológica.

4. CONCLUSÃO

Os extrato vegetais de *Palicourea coriacea*, PC-ETOH e PC-MEOH, apresentam uma baixa atividade citostática sobre as células macrófago de camundongo; O extrato vegetal de *Palicourea coriacea*, PC-ETOH, apresenta baixa atividade citostática na linhagem de células tumorais sarcoma 180; O extrato vegetal, PC-MEOH, não apresentou nenhuma atividade citostática na linhagem de células tumorais sarcoma 180; O composto cis-tetraaminoxalatorutênio (III) apresenta uma elevada atividade citostática sobre a linhagem de células tumorais de sarcoma 180.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KEPPLER, B. K. Metal complexes as anticancer agents. *New J. Chem.* 1990, 14, 389.
- CLARKE, M.J. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord. Chemistry Rev.*, v.236, p. 209-233, 2003.
- NASCIMENTO, C. A do. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Palicourea coriacea* (RUBIACEAE). Goiânia, 2005, 130p. Dissertação (mestrado). Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás.