



# Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L.

Egidi Mayara Firmino Silva<sup>1,\*</sup>; Renata Barreto de Castro Nascimento<sup>1</sup>; Francisco Stefânio Barreto<sup>2</sup>; Manoel Odorico de Moraes Filho<sup>2</sup>; Samara de Almeida Souza Griz<sup>3</sup>; Aldenir Feitosa dos Santos<sup>3</sup>; Kristiana Cerqueira Mousinho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário CESMAC, Graduanda em Farmácia, Campus I, Maceió, AL, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará – UFC, Centro de ciências da Saúde, Laboratório Nacional de Oncologia Experimental, Crato, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Centro Universitário CESMAC, Curso de Farmácia, Campus I, Maceió, AL, Brasil.

## RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade citotóxica do extrato etanólico da casca do caule (AMC) e folha (AMF) da *Annona muricata* Linn. Para a realização desse estudo, inicialmente foi verificada a atividade do extrato etanólico nas concentrações de 1000, 800, 600, 200 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para AMF e concentrações de 200, 150, 100, 50, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para AMC através do ensaio de *Artemia salina* Leach que é considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos com forte atividade biológica e permite realizar a avaliação da toxicidade envolvendo apenas um parâmetro: vida ou morte. Posteriormente foi realizado o ensaio de citotoxicidade através do método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina em linhagens de SF-295 (glioblastoma - humano), OVCAR-8 (ovário) HCT-116 (colón) e HL-60 (leucemia promielocítica). Os extratos foram testados na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o teste de citotoxicidade de concentração única para verificar ausência ou presença de atividade. Para a determinação da concentração inibitória ( $\text{CI}_{50}$ ), todas as amostras foram testadas em concentrações seriadas que variaram de 0,09 a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando 2 como fator de diluição. No presente estudo, as duas amostras utilizadas através do ensaio de *Artemia salina* Leach apresentaram concentração letal ( $\text{CL}_{50}$ ) superiores a 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A folha apresentou  $\text{CL}_{50} = 324,07 \mu\text{g mL}^{-1}$  e a casca do caule apresentou  $\text{CL}_{50} = 196,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Já através do teste do MTT os valores de concentração inibitória ( $\text{CI}_{50}$ ) variaram de 12,81 a 22,65  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para AMF e de 0,09 a <5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para AMC, frente as diferentes linhagens tumorais avaliadas. Diante dos resultados obtidos para a casca e folhas de *A. muricata*, avaliadas neste trabalho através dos bioensaios de toxicidade com *Artemia salina* Leach e com as células tumorais SF-295, OVCAR-8, HCT-116 e HL-60, pode-se verificar o potencial tóxico de ambas as amostras, destacando-se mais as cascas que tiveram um potencial citotóxico maior. Devido a este fato, novos experimentos devem ser conduzidos para investigar melhor o potencial antitumoral das cascas do caule de *A. muricata*.

Palavras Chaves: Citotoxicidade. *Artemia salina* Leach. MTT. *Annona muricata*.Linn.

Autor correspondente: Egidi Mayara Firmino Silva, Centro Universitário CESMAC, Curso de Farmácia, Campus I, Maceió, AL, Brasil. E-mail: mayara\_firmino@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais como terapia farmacológica para o tratamento de várias doenças e na produção de medicamentos vem sendo empregada há vários anos (Ponzi et al., 2010).

Segundo Guerra & Nodari (2007) plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, constituindo-se em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. O interesse pelo potencial terapêutico das plantas medicinais vem aumentando a cada ano, esse fato é comprovado pela grande quantidade de pesquisas realizadas no mundo (Yunes et al., 2001; Koehn & Carter, 2005).

Desde a década de 70, a busca por terapias alternativas se intensificou, tendo sido registrado um aumento da sua utilização de aproximadamente 2 a 3% ao ano (Souza, 2004). O estudo de Houghton et al., (2007) afirma que, das novas descobertas de drogas nos últimos quarenta anos, uma parte significativa tem sido focada em agentes para a prevenção e o tratamento de câncer, já que o câncer está entre as três causas mais comuns de morte e morbidade na maioria dos países desenvolvidos e, cada vez mais nos países em desenvolvimento.

O tratamento de câncer depende do tipo e da gravidade da doença. O tratamento destes tumores pode ser realizado com cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou, ainda, com a combinação dessas técnicas (Facina, 2011). Alguns estudos demonstram que existem aproximadamente 700 espécies de plantas, que apresentam atividades sobre tumores malignos (Flores, 2013).

Como uma boa ferramenta na identificação de drogas com atividade anticâncer, a utilização de testes simples e rápidos para a avaliação de atividades biológicas, vem sendo utilizados para obtenção de melhores indicações na utilização das plantas (Said et al., 1998).

Os ensaios de letalidade em organismos simples estão entre os ensaios mais citados, como o microcrustáceo marinho *Artemia salina* Leach. Os testes de toxicidade têm como objetivo avaliar a sobrevivência de indivíduos expostos a

um agente ou amostra a ser analisada, por um determinado período de tempo (Grinevicius, 2006).

A *Artemia salina*, tem sido utilizada em testes de toxicidade devido a sua capacidade de formar cistos dormentes, fornecendo deste modo, material biológico que pode ser armazenado durante longo período de tempo sem perdas de viabilidade e sem necessidade de se manterem culturas contínuas. É uma espécie de fácil manipulação em laboratórios e baixo custo econômico.

A *Artemia salina* está presente em todo mundo adaptando-se a regiões de salinidade alta, desenvolveu um sistema de osmoregulação e proteção a condições adversas. Esse sistema permite a sua sobrevivência em seu ambiente natural, o qual possui uma salinidade em torno de 70%. Pertence ao filo Arthropoda, classe Crustácea (Pelka e cols., 2000). A *Artemia salina* tem sido muito utilizada como indicador de toxicidade e no isolamento de compostos bioativos, apresentando como vantagens ser de baixo custo, fácil manuseio, não necessitar de equipamentos ou técnicas assépticas, resultado rápido e reprodutível. É importante ressaltar que com relação à reprodutibilidade, devemos considerar parâmetros como temperatura, composição e salinidade do meio e a idade das larvas devem ser considerados (Hartl e Humpf, 2000).

Outro teste muito realizado é o de citotoxicidade através do método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). É definido na literatura como apropriado para estimar a citotoxicidade (Costa-Lotufu et al, 2004). O ensaio de MTT é um dos mais empregados como indicador colorimétrico da viabilidade celular, avaliando-se a função mitocondrial da célula (Godói et al., 2011).

Segundo Mossman (1983), o método MTT é uma análise colorimétrica que se baseia na conversão do sal (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais que existem somente nas células que são metabolicamente ativas.

Na necessidade de novos tratamentos e da descoberta de outras substâncias que auxiliem no tratamento do câncer, Oberlies, et al. (1997) descobriram em seus estudos que a graviola (*Annona muricata* Linn.), apresenta atividade eficiente contra o câncer.

A *Annona muricata*, popularmente conhecida como graviola, é uma árvore de pequeno porte pertencente à família Annonaceae (Azevedo, 2004). Tradicionalmente, em muitos países, quase todas as partes da *Annona* são usadas como forma terapêutica (Raintree, 2007).

Apesar de poucos estudos feitos sobre os efeitos da *Annona muricata* em seres humanos, Oberlies et al. (1987) acreditam que a graviola pode ser também, um medicamento eficaz no controle da proliferação de células tumorais.

Portanto, no contexto de buscar compostos bioativos, despertou-se o interesse em contribuir com a investigação do potencial antitumoral de *A. muricata*. Para tanto, os extratos etanólicos de casca e folhas de *A. muricata* foram

avaliados, através da metodologia do MTT, acerca do seu potencial citotóxico contra as células SF-295, OVCAR-8, HCT-116 e HL-60.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material Vegetal e Preparação do extrato*

As folhas e as cascas do caule da *Annona muricata*, foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Alagoas, na cidade de Maceió, Alagoas, Brasil. A *Annona muricata* foi depositada e registrada no herbário do IMA-AL, sob registro número 34903. As folhas e as cascas do caule da espécie vegetal foram secas em estufa à temperatura de 40° C por um período de 48 horas. Após secagem as partes do vegetal foram pesadas e maceradas em etanol à temperatura ambiente durante 72 horas. O extrato foi filtrado e evaporado em rota-evaporador rotativo acoplado à bomba de vácuo para a retirada do solvente, assim foi obtido o extrato bruto o qual foi armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração. Para os testes realizados os extratos foram classificados em AMC, para o extrato da casca do caule e AMF para a extração feita com as folhas.

### *Determinação da toxicidade Artemia salina Leach*

Segundo Cavalcante et al. (2000), a realização do ensaio de letalidade, empregando como bioindicador a *Artemia salina* L. permite realizar a avaliação da toxicidade envolvendo apenas um parâmetro: vida ou morte, sendo assim, considerado como ensaio preliminar na identificação de compostos bioativos de baixo custo e fácil manuseio. A ausência de citotoxicidade dos extratos testados frente à *A. salina* é um indicador de que a planta ou seus órgãos podem ser bem tolerados frente ao sistema biológico (Stefanello et al., 2006).

Para a obtenção de larvas de *A. salina*, cistos deste material biológico foram adquiridos em lojas de aquaristas e induzidos à eclosão quando imersos em água do mar (pH 7) e temperatura ambiente, e postos em recipiente parcialmente iluminado com luz artificial (60 W), por um período correspondente a 24 horas. Decorridas 24 horas, as larvas eclodidas foram coletadas com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidas para placas de meio de cultura (10 cm de diâmetro) onde foram mantidas em observação por mais 24 horas até atingirem estágio de II instar. Desta forma foi possível utilizar nos ensaios de toxicidade uma população homogênea de larvas de II instar (Vanhaecke et al., 1981).

### *Ensaio biológico de toxicidade contra a Artemia salina (TAS) preliminar*

Nesta etapa, a solução estoque foi preparada a 3.000 µg mL<sup>-1</sup> através da dissolução do extrato vegetal em água do mar a 0,05% de DMSO. Alíquotas desta solução estoque foram adicionadas à água do mar ou salmoura (0,38% m/v) para obtenção das concentrações de 3000, 300, 30 e 3 µg mL<sup>-1</sup> e a partir destas, as concentrações-teste de 1000, 100, 10 e 1 µg mL<sup>-1</sup>, nas quais foram introduzidas em média

10 a 20 microcrustáceos. Cada concentração-teste foi realizada em duplicata em um volume final de 150  $\mu\text{L}$ . Os extratos que promoveram mortalidade maior que 30% na concentração de 1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram submetidos aos testes apurados com a *A. salina*.

#### Ensaio biológico TAS apurado

Nesta etapa cada concentração foi testada em um volume final de 5 mL e em quadruplicata, sendo introduzidas 10 artemias por poço-teste. As concentrações foram selecionadas em função dos resultados preliminares. O procedimento utilizado foi similar ao descrito por Meyer e cols. (1982). O extrato das folhas de *Annona muricata* foram testados nas concentrações de 1000, 800, 600, 200 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e da casca do caule nas concentrações de 200, 150, 100, 50, 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Em ambas as etapas do teste TAS, as larvas foram colocadas em contato com as soluções dos extratos por 24 horas, e após este período foi determinado o número de mortos e sobreviventes. Foram consideradas mortas às larvas que permaneceram imóveis mesmo quando induzidas ao movimento. Paralelos a cada bioensaio foram realizados ensaios com solução aquosa de timol 1% e água do mar a 0,05% de DMSO, usados como controle positivo e negativo, respectivamente. Os valores de concentração letal ( $\text{CL}_{90}$ ,  $\text{CL}_{50}$  e  $\text{CL}_{10}$ ) foram estatisticamente calculados.

#### Análise estatística

Os dados foram analisados através do método de Probit e expressos como concentração letal correspondente a 50% ( $\text{CL}_{50}$ ) com Intervalo de Confiança de 95% (IC95).

#### Ensaio de citotoxicidade em células tumorais

As linhagens tumorais utilizadas, SF-295 (glioblastoma - humano), OVCAR-8 (ovário) HCT-116 (colón) e HL-60 (leucemia promielocítica) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) para o Laboratório Nacional de Oncologia (LabNOE), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina e estreptomicina), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

Os extratos AMC e AMF foram diluídos em DMSO puro estéril. Os extratos foram testados na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  para o teste de citotoxicidade de concentração única para verificar ausência ou presença de atividade. Para a determinação da concentração inibitória média ( $\text{CI}_{50}$ ), todas as amostras foram testadas em concentrações seriadas que variaram de 0,09 a 50  $\mu\text{g/mL}$  utilizando 2 como fator de diluição.

#### Procedimento experimental

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10<sup>6</sup> células/mL para as linhagens SF-295 e OVCAR-8, de 0,3 x10<sup>6</sup> para linhagem HL-60 e de 0,7 x 10<sup>5</sup> células/mL para a linhagem HCT-116. Posteriormente foram adicionados os extratos, AMF e AMC, nas concentrações

testadas. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C 3h antes do término do período de incubação foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (sal de tetrazolium) e incubado por mais 3h. Ao término deste, a placa com as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes, removidos e adicionado DMSO estéril. As absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo do teste na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ .

#### Análise dos dados

Para a atividade citotóxica, amostras que tiveram percentual de inibição na dose única superior a 75% foram escolhidas para determinação da concentração inibitória média ( $\text{IC}_{50}$ ).

Os experimentos foram realizados em duplicata e analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular e  $\text{CI}_{50}$  e teste de regressão não-linear para a curva, usando o programa *GraphPad Prism®*, versão 5.0.

## RESULTADOS

Com base nos resultados expostos na (Tabela 1), a *Annona muricata* sob a forma de extrato etanólico foi considerada tóxica frente à *Artemia salina* na maioria das concentrações testadas tanto da folha como da casca do caule. A folha apresentou um maior percentual de atividade citotóxica de 100% na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e o caule apresentou um maior percentual de atividade de 73,3% na concentração de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

As duas amostras utilizadas apresentaram  $\text{CL}_{50}$  superiores a 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A folha apresentou  $\text{CL}_{50} = 324,07$   $\mu\text{g mL}^{-1}$  e a casca do caule apresentou  $\text{CL}_{50} = 196,04$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Com isso observa-se que a casca do caule da *Annona muricata* Linn apresentou uma maior potencial citotóxico que a folha da *Annona muricata* L.

Os resultados da atividade citotóxica de concentração única de 50  $\mu\text{g/mL}$  das amostras de AMC e AMF, através do método MTT, para verificar a presença ou ausência de atividade estão apresentados na Tabela 2, com seus respectivos percentuais de inibição.

O extrato da casca do caule da *Annona muricata* apresentou ação citotóxica em todas as linhagens testadas, com o maior percentual de inibição média de 100% na linhagem SF-295 (glioblastoma - humano) e menor percentual de inibição média de 89,63 para a linhagem HL-60 (leucemia promielocítica), enquanto que o extrato da folha da *Annona muricata* apresentou alto potencial citotóxico para a linhagem de HL-60 com percentual de inibição de 100% e uma atividade moderada para a linhagem OVCAR-8 com um percentual de inibição média de 71,57%.

A concentração inibitória correspondente a 50% ( $\text{CI}_{50}$ ), está representada na Tabela 3. Os valores de concentração inibitória ( $\text{CI}_{50}$ ) variaram de 12,81 a 22,65

Tabela 1 - Atividades citotóxicas de espécies vegetais frente a *Artemia salina*

Amostra	Partes	Conc. (gmL <sup>-1</sup> )	% de mortos	Larvas de <i>Artemia salina</i>		
				Após 24hs (gmL <sup>-1</sup> )		
				CL10	CL <sub>50</sub>	CL90
<i>Annona muricata</i> L. (Annonaceae)	Folha	1000	100	50 IC95 = 12,05-63,4	324,07 IC95= 253,00-398,74	598,02 IC95= 500,03-657,02
		800	100			
		600	96,7			
		400	83			
		200	23,3			
	Casca do caule	200	73,3	IC95 = 8,74 6,32-9,00	196,04 IC95= 188,02-234,22	295,02 IC95= 245,00-287,08
		150	43,3			
		100	36,7			
		50	26,7			
		10	23,3			

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2 – Atividade citotóxica *in vitro* do extrato etanólico da AMF e AMC frente às linhagens tumorais humanas SF-295 (glioblastoma - humano), OVCAR-8 (ovário), HCT-116 (colón) e HL-60 (leucemia promielocítica).

FRAÇÕES	SF-295		HCT-116		OVCAR-8		HL-60	
	Inibição média (%)	DP	Inibição média (%)	DP	Inibição média (%)	DP	Inibição média (%)	DP
<i>A. muricata</i> Caule (AMC)	100,00	0,34	99,00	0,12	91,46	10,74	89,63	
<i>A. muricata</i> Folha (AMF)	99,51	-	95,52	0,77	71,57	23,56	100	

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 3 - Atividade citotóxica *in vitro* do extrato etanólico de AMF e AMC frente às linhagens tumorais humanas SF-295 (glioblastoma - humano), OVCAR-8 (ovário), HCT-116 (colón) e HL-60 (leucemia promielocítica).

FRAÇÕES	Concentração Inibitória IC <sub>50</sub> (µg/mL)			
	HCT-116	HL-60	SF-295	OVCAR-8
<i>A. muricata</i> Folha (AMF)	19,97 (17,41 – 22,91)	15,39 (2,190 - 108,2)	12,81 (10,84 – 15,13)	22,65 (19,85 – 25,84)
<i>A. muricata</i> Caule (AMC)	0,91 (0,20 – 4,12)	7,67 (5,45 – 10,80)	0,09 (0,05 – 0,16)	<5 µg/mL
Doxorrubicina	0,12 (0,09 – 0,17)	0,02 (0,01 – 0,02)	0,24 (0,2 – 0,27)	0,26 (0,17 – 0,30)

\* A tabela apresenta os valores de concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) em µg/mL, originados de experimentos independentes (n=3) obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95% através do programa *GraphPad Prisma* versão 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA).

Fonte: Dados da pesquisa.

µg/ml para AMF e de 0,09 a < 5 µg/mL para AMC, frente às diferentes linhagens tumorais avaliadas. Os extratos de AMF e AMC apresentaram um potencial citotóxico significativo em todas as linhagens quando equiparável com o controle positivo testado com doxorrubicina.

## DISCUSSÃO

A planta *Annona muricata* vem sendo considerada como uma fonte potencial de compostos anticâncer, despertando a atenção e curiosidade dos cientistas pelo fato de ser utilizada em várias partes do mundo por diferentes culturas (Meyer et al., 1982). Segundo Quispe et al. (2006) vários estudos de citotoxicidade têm avaliado a atividade antitumoral de compostos presentes em *Annona muricata* L. contra diversas linhagens celulares tumorais *in vitro* como, por exemplo, contra células de carcinoma pancreático e prostático, carcinoma pulmonar, de mama, epidermóide.

Com a proposta de verificar a toxicidade de novos compostos bioativos, vários ensaios são utilizados como o

ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido para detectar compostos ativos em extratos vegetais (Silva et al., 2005), mas que pode ser utilizado para expressar a toxicidade de um extrato contra outros organismos vivos, como peixes e pequenos crustáceos (Lima et al., 2002).

Estudos realizados por Melo et al., (2006) os extratos são classificados de acordo com os seguintes critérios de avaliação da toxicidade: extratos com CL<sub>50</sub> menor que 80 µg/mL são considerados moderadamente tóxicos, os extratos com CL<sub>50</sub> entre 80 µg/mL e 250 µg/mL são classificados como pouco tóxicos. Em estudos Meyer et al. (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL<sub>50</sub>, apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *Artemia salina* L. desde então, considera-se que quando são verificados valores acima 1000 µg/mL, estes, são considerados atóxicos.

Nesse estudo foram avaliadas as toxicidades frente à *Artemia salina* dos extratos de AMF e AMC. Percebe-se que a concentração de substâncias que provoca a letalidade

de metade dos organismos testes ( $CL_{50}$ ) foram satisfatórios em ambas as amostras, com valores de  $CL_{50}$  maiores que 80  $\mu\text{g/mL}$ . Com base nos resultados expostos neste estudo e baseado na classificação de Meyer et al. (1982), a *Annona muricata* L. sob a forma de extrato etanólico foi considerada com uma atividade promissora frente à *Artemia salina* na maioria das concentrações testadas da folha e da casca do caule.

Para comprovação da existência de uma correlação qualitativa entre o teste de *A. salina* com outro ensaio biológico, foi realizado o ensaio do MTT, testando as linhagens tumorais humanas de HCT-116, SF-295, OVCAR-8 e HL-60.

A  $CI_{50}$  encontradas nesse estudo variaram de 12,81 a 22,65  $\mu\text{g/mL}$  para AMF e de 0,09 a  $<5$   $\mu\text{g/mL}$  para AMC, frente às diferentes linhagens tumorais avaliadas. Observa-se que ambas as amostras apresentaram um potencial de inibição do crescimento celular, assim como encontrado nos estudos de Oliveira (2012), que mostram a atividade do extrato acetônico das folhas da *Annona muricata*, com potencial citotóxico contra K-562 (Leucemina mielocíclica crônica humana) e  $CI_{50}$  de 0,1452  $\mu\text{g/mL}$ , na HCT-116 com valor de  $CI_{50}$  0,2956  $\mu\text{g/mL}$  e SF-295, com valor de  $CI_{50}$  0,2191  $\mu\text{g/mL}$ .

Outros trabalhos demonstram que a *Annona muricata* apresenta ação citotóxica também frente a outros tipos de linhagens tumorais. No estudo de Zachos e Spandidos (1997) as linhagens de câncer de cólon, HCT-8 e 116 conferem uma resistência específica aos tratamentos convencionais, devido à existência de uma mutação no gene Ras. Nesse estudo, observou-se o alto potencial citotóxico da *Annona muricata* frente à HCT-116 tanto na AMC quanto na AMF.

Pesquisas realizadas *in vitro* têm demonstrado que espécies da família Annonaceae, possuem atividade com inibição do crescimento de células tumorais humanas, como as células leucêmicas- U937 (Jaramillo et al., 2000). Na análise do extrato hidroetanólico das folhas de *Annona muricata*, pesquisadores verificaram alta toxicidade por parte do vegetal, corroborando com estudos de Luna et al. (2006) com o extrato etanólico.

Assim como nos resultados encontrados neste estudo, onde percebe-se a inibição do crescimento celular em alguns tipos de linhagens tumorais através do método MTT, observa-se que em estudos realizado por Torres et al. (2012) a *Annona muricata* também inibe outras linhagens celulares, como a metástase de células cancerosas do pâncreas, através da alteração metabolismo celular a partir do ensaio de citotoxicidade de MTT, onde os mesmos indicaram uma diminuição progressiva da viabilidade celular com o aumento sucessivo nas concentrações do extrato testado.

Resultados de testes *in vivo* também mostram que a *Annona muricata* possui atividade anticâncer. No trabalho de Barbosa (2009), o extrato etanólico das folhas da Annona, mostrou redução da massa tumoral frente à linhagem de Sarcoma 180 em camundongos, com

percentual de inibição tumoral de 57% na concentração de 30mg/Kg e 80% quando tratados com 100mg/Kg.

Diante dos resultados obtidos para a casca e folhas de *A. muricata*, avaliadas neste trabalho através dos bioensaios de toxicidade com *Artemia salina* e com as células tumorais SF-295, OVCAR-8, HCT-116 e HL-60, pode-se verificar o potencial tóxico de ambas as amostras, destacando-se mais as cascas que tiveram um potencial citotóxico maior. Devido a este fato, novos experimentos devem ser conduzidos para investigar melhor o potencial antitumoral das cascas do caule de *A. muricata*.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao SANTANDER pelo apoio financeiro.

## ABSTRACT

*In vitro* study of the cytotoxic potential of *Annona muricata* L.

**This study aims to evaluate the cytotoxic activity of the ethanol extract of the stem bark (AMC) and leaf (MFA) of *Annona muricata* Linn. To conduct this study was initially verified the activity of the ethanol extract at concentrations of 1000, 800, 600, 200 and 100  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  for MFA and concentrations of 200, 150, 100, 50, 10  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  for AMC through assay of *Artemia salina* Leach which is considered a preliminary study on bioassay of extracts with strong biological activity. Subsequently, the cytotoxicity assay was performed using the MTT (method 3 - (4,5 -dimethylthiazol- 2YL) -2,5- diphenyl bromide in tetrazolina lines SF- 295 (glioblastoma - human), OVCAR -8 (ovarian) HCT -116 (colon) and HL -60 (promyelocytic leukemia). The extracts were tested at a concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$  for the single concentration cytotoxicity test to determine the presence or absence of activity. For determination of inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ), all samples were tested in serial concentrations ranging from 0, 09 to 50  $\mu\text{g/mL}$  using 2 as the dilution factor. The present study, both samples used by testing *Artemia salina* Leach had higher  $LC_{50}$  80  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ . Sheet presented  $LC_{50} = 324, 07$   $\mu\text{g/mL}^{-1}$  and stem bark showed  $LC_{50} = 196, 04$   $\mu\text{g/mL}^{-1}$ . Already through MTT inhibitory concentration values ( $IC_{50}$ ) ranged from 12, 81 to 22,65  $\mu\text{g/mL}$  for MFA and from 0,09 to  $<5$   $\mu\text{g/mL}$  for AMC, evaluated against various tumor cell lines. Results obtained for the bark and leaves of *A. muricata*, evaluated in this work through toxicity bioassays with *Artemia salina* L and tumor cells SF-295, OVCAR-8, HCT-116 and HL-60, we can verify the toxic potential of both samples, especially more hulls which had a higher cytotoxic potential. Due to this fact, further experiments should be conducted to further investigate the antitumor potential of the stem bark of *A. muricata*.**

Key Words: Cytotoxicity. *Annona muricata*. Linn. *Artemia salina* Leach. MTT.

## REFERÊNCIAS

- Azevedo R. Anonáceas vão à Bangkok, in: EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Novembro, 2004. [Acesso em: 7 nov 2013]. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias>>.
- Barbosa CV. Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL. 98p. [Dissertação de Mestrado] – Maceió – AL, Universidade Federal de Alagoas; 2009.
- Cavalcante, MF et al. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. Quím. Nova, São Paulo. 2000;23(1):20-2.
- Costa-Lotufo LV, Araújo ECC, Lima MAS, Moraes MEA, Pessoa C, Silveira ER, Moraes MO Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). Pharmazie. 2004;58:78-9.
- Facina T. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.
- Flores D. O uso de fitoterapia pelas gestantes: mito ou realidade [monografia]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2003.
- Godói AA, Ishikawa BB, Porto KRA, Roel AR, Xavier PCX, Yano, M. Avaliação da atividade antioxidante, antibacteriana e citotóxica de *Urera aurantiaca*. Rev Bras Farm. 2011;92(3):198-202.
- Grinevicus VM A de S. Avaliação da remediação de percolados de uma indústria têxtil utilizando bioindicadores e biomarcadores. 179 f. [Dissertação Mestrado] – Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.
- Guerra MP, Nodari RO. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos (cap.1). In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC; 2007. p. 13-28.
- Hartl M, Humpf HU. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. Food Chem Toxicol. 2000;38:1097-102
- Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. Methods. 2007;42:377-87.
- Jaramillo MC, Arango GJ, González MC, Robledo SM, Velez ID. Cytotoxicity and anti-*Leishmanial* activity of *Annona muricata* pericarp. Fitoterapia. 2000;71:183-6.
- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:206-20.
- Lima NMF, dos Santos AF, Porfírio Z, Goulart MOF, Sant'Ana AEG. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. Acta Trop. 2002;83:43-7.
- Luna JDS, De Carvalho JM, De Lima MRF, Bieber LW, Bento EDS, Franck X, et al. Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. Nat Prod Res. 2006;20:253-7.
- Melo, LFA. et al. Avaliação da toxicidade de extratos brutos hexânico e etanólico de três espécies de cnidários sobre *Artemia salina* Leach. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 19 a 22 de maio de 2006. [acesso em: 06 de nov 2013] Disponível em: <<https://sec.s bq.org.br/cd29ra/resumos/T1422-2.pdf>>.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 1982;45:31-4.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Method. 1983;65:55-63.
- Oberlies NH, Chang CJ, McLaughlin JL. Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. J Med Chem. 1997;40:2102-6.
- Oliveira CC. Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. [tese de doutorado]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2012.
- Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. J Dent. 2000;28:341-5.
- Ponzi EAC, Oliveira TL, Morais IAF, Júnior JJS, Gerbi MM, Souza A et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. Rev Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac. [online]. 2010;10(1):89-94.
- Quispe MA, Zavala CD, Rojas CJ. Efecto citotóxico selectivo *in vitro* de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. Rev Peruana Med Exp Salud Publica. 2006;23(4):265-9.
- Raintree N. Tropical Plant Database. Raintree Nutrition, Inc., Carson City, NV 89701. 2007. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/graviola.htm>>. [Acesso em: 6 nov. 2013.]
- Said IM, Bin Din L, Samsudin MW, Yusoff NI, Latiff A, Ali RM, Hadi AHA. A phytochemical survey of Sayap-Kinabalu Park, Sabah. ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC); 1998 [acesso em 21 jul 2008]. Disponível em: <<http://www.arbec.com.my/pdf/july-6.pdf>>.
- Silva TMS, Batista MM, Camara CA, Agra MF. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp.

(Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005;99:419-25.

Souza M. Terapias alternativas e alternativas perigosas [online]. [acesso em: 06 de novembro de 2013]. Disponível em: <<http://www.capc.org.br/terapias.htm>>.

Stefanello MEA, Salvador MJ, Ito MY, Macari PAT. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha ssp floccosa*. *Rev Bras Farmacogn*. 2006;16(4):525-30.

Yunes RA, Pedrosa RC, Cechinel Filho. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim Nova*. 2001;1:147-52.

Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol Environment Safety*. 1981;5:382-7.

Zachos G, Spandidos DA. Expression of ras proto-oncogenes: regulation and implications in the development of human tumors. *Crit Rev Oncol/Hematol*. 1997;26(2):65-75.

Recebido em 9 de dezembro de 2013

Aceito em 12 de fevereiro de 2014

