



Exacta

ISSN: 1678-5428

exacta@uninove.br

Universidade Nove de Julho  
Brasil

Vieira Berti, Fernanda; Pértile, Renata Aparecida; Mota Siqueira, Jarbas; Ribeiro do Valle, Rosa Maria;  
Dias, Paulo Fernando; Marques Porto, Luismar  
Estudo in vitro do efeito antitumoral da aloína em cultura de células de melanoma  
Exacta, vol. 5, núm. 1, janeiro-junho, 2007, pp. 169-176  
Universidade Nove de Julho  
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81050118>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica  
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Estudo *in vitro* do efeito antitumoral da aloína em cultura de células de melanoma<sup>1</sup>

Fernanda Vieira Berti

Mestranda do curso de pós-graduação  
em Engenharia Química – UFSC.  
Florianópolis – SC [Brasil]  
fernanda@intelab.ufsc.br

Renata Aparecida Nedel Pértile

Mestranda de curso de pós-graduação  
em Engenharia Química – UFSC.  
Florianópolis – SC [Brasil]  
renata@intelab.ufsc.br

Jarbas Mota Siqueira Junior

Pós-doutorando do curso de Farmacologia – UFSC.  
Florianópolis – SC [Brasil]  
jarbasms@farmaco.ufsc.br

Rosa Maria Ribeiro do Valle

Prof. Dr. do Departamento de Farmacologia – UFSC.  
Florianópolis – SC [Brasil]  
ribeiro@farmaco.ufsc.br

Paulo Fernando Dias

Prof. Dr. do Departamento de Ciências Biológicas – UFSC.  
Florianópolis – SC [Brasil]  
paulus@mbox1.ufsc.br

Luismar Marques Porto

Prof. Dr. do Departamento de Engenharia Química  
e Engenharia de Alimentos – UFSC.  
Florianópolis – SC [Brasil]  
luismar@intelab.ufsc.br

A identificação, extração, isolamento e caracterização de princípios ativos vegetais que modulam a viabilidade celular são de grande interesse clínico e farmacológico. Testes fitoquímicos têm demonstrado a presença de vários compostos, oriundos dos metabolismos primário e secundário da *Aloe vera* L. A aloína é uma antraquinona isolada do parênquima clorofiliano da *A. vera* L que, sabe-se, apresenta atividade biológica. A atividade antitumoral da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano foi avaliada, *in vitro*, com a utilização de células de melanoma de camundongo da linhagem B16-F10. Nessa análise, células incubadas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> foram tratadas em diferentes concentrações de aloína e de extrato do parênquima, a 37°C. A aloína e o extrato alteraram a estabilidade celular, exercendo efeito modulador sobre a viabilidade das células tumorais. Os dados experimentais foram representados por meio de um modelo matemático. Neste estudo, verificou-se que o extrato do parênquima clorofiliano é 2,3 vezes mais tóxico que a aloína.

**Palavras-chave:** *Aloe vera* L. Aloína. B16-F10.

Extrato do parênquima clorofiliano. Modelagem matemática.  
Viabilidade celular.



aloína. Esse composto é sensível à luz, ao pH e à temperatura, podendo ser oxidada a aloe emodina. Atualmente muitos compostos originários da *Aloe vera* têm sido testados na cura de doenças como asma, isquemia, hipertensão, psoríase, artrite reumatóide e vários tipos de câncer.

Tumores crescem e desenvolvem metástases por meio da formação de vasos sanguíneos (neoangiogênese). Processos de vasculogênese e angiogênese são importantes na estruturação de tecidos vascularizados e podem ser induzidos e potencialmente controlados por substâncias bioativas, extraídas de espécies vegetais. No entanto, as drogas podem agir no tumor, atingindo diretamente as células cancerosas ou modulando a formação de vasos que são essenciais para sua sobrevivência.

As antraquinonas têm sido freqüentemente utilizadas na medicina como agentes antipsoríase. Seu modo de ação não é exatamente conhecido, ainda que muitas moléculas biológicas e tipos celulares tenham sido identificados como alvos potenciais. Derivados antraquinônicos também mostraram inibir várias viroses *in vitro*, incluindo herpes simples do tipo 1 e 2, varicela-zoster e influenza (SYDISKIS et al., 1991). Algumas propriedades terapêuticas importantes, comuns aos extratos e compostos isolados da *A. barbadensis*, particularmente as atividades antiinflamatória e antitumoral, sugerem, por hipótese, que alguns desses princípios ativos sejam também moduladores eficazes da formação de vasos sanguíneos, isto é, vasculogênese e angiogênese.

As atividades biológicas estudadas em sistemas-modelo podem ser acompanhadas de processos de modelagem matemático-computacional. Esses modelos aprimoram a compreensão sobre os mecanismos farmacológicos envolvidos. A modelagem computacional trata da simulação de soluções para problemas científicos, analisando os fenômenos, desenvolvendo modelos matemáticos para sua descrição, e elaborando códigos compu-

tacionais para obtenção dos resultados almejados. A sofisticação dos problemas com que a humanidade se tem deparado nas últimas décadas, em áreas tão diversas como a nanotecnologia, a genômica, a bioinformática e o desenvolvimento de novos materiais, exige respostas exponencialmente mais complexas do que aquelas que se buscavam no passado. Essas mudanças propõem, para a ciência e para a comunidade científica, um desafio: a necessidade de conseguir respostas cada vez mais sofisticadas, objetivando tratar daquela complexidade, em tempo sucessivamente menor e pela solução de problemas complexos. Os fenômenos da natureza podem ser convenientemente representados por modelos matemáticos, governados por equações que expressam as relações envolvidas e os parâmetros que as qualificam.

Este trabalho está inserido em um programa de pesquisa que tem como objetivo obter e investigar compostos bioativos, de alto valor agregado, derivados de produtos naturais, que possam ser utilizados em prol da saúde humana. Especificamente, pretende-se avaliar de que forma a aloína e o extrato do parênquima clorofiliano de *A. barbadensis* Miller agem sobre as células de melanoma da linhagem B16-F10 e representar esses resultados e tendências por meio de um modelo matemático adequado. Tem-se, dessa maneira, como perspectiva, a caracterização dos efeitos profiláticos e/ou terapêuticos desses princípios ativos vegetais, por intermédio de parâmetros que possam ser úteis ao projeto de produtos terapêuticos, considerando sua potencial aplicação como insumos farmacêuticos.

## 2 Materiais e métodos

### 2.1 Avaliação da viabilidade celular

Células de melanoma da linhagem B16-F10, na densidade de  $2,5 \times 10^3$  células por poço, foram



incubadas em uma placa de 96 poços, contendo 100  $\mu\text{L}$  por poço de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco, BRL), 2 mM de L-glutamina, 4,5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose, 1,5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de bicarbonato de sódio, 100 mL de penicilina e estreptomicina, em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C.

Após vinte e quatro horas de incubação, o meio de cultura DMEM foi removido, e as células, tratadas com concentrações crescentes de aloína e extrato do parênquima clorofiliano da espécie *A. barbadensis* Miller. A pureza da aloína utilizada foi estimada em cerca de 97% (Padrão Fluka 06088). As soluções foram preparadas cuidadosamente sob incidência de luz vermelha, evitando a degradação da aloína e de compostos antraquinônicos sensíveis. As concentrações de extrato do parênquima clorofiliano utilizadas corresponderam a 0,01  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e as concentrações de aloína, a 0,01  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e 230  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , todas diluídas em meio de cultura DMEM.

As soluções foram removidas dos poços, após quarenta e oito horas, e adicionados 100  $\mu\text{L}$ , em cada poço, de uma solução contendo 10  $\mu\text{L}$  de reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiasol-2-il]-2,5-difeniltetrazol) e 90  $\mu\text{L}$  de meio de cultura DMEM, para examinar a função mitocondrial das células viáveis (CARMICHAEL et al., 1987).

As células foram novamente incubadas por 4,5 horas, a 37°C. Logo após a remoção desses reagentes, adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de solução DMSO por poço. A absorbância a 550 nm foi medida em um leitor de microplacas automático (Wallac, modelo Victor 2, workstation 1420 multilabel counter). Os resultados foram expressos na forma de densidade óptica relativa ao máximo número de células observadas durante os experimentos com a aloína-padrão, o que corresponde, aproximada-

mente, à mesma densidade óptica verificada para os poços de solução controle. No grupo controle as células foram tratadas apenas com meio de cultura DMEM. Estima-se que, para cada poço de 100  $\mu\text{L}$ , 2.500 células estavam presentes vinte e quatro horas antes do início dos experimentos, período de adaptação celular ao meio de cultura.

Os equipamentos utilizados para a realização dos experimentos foram os seguintes: microscópio Bioval XDS-1B, centrífuga Baby STOP, estufa de  $\text{CO}_2$  Ultrasafe HF 212UV, leitor de microplacas automático, câmara de Neubauer Loptik Labor e câmara de fluxo (UV, 0,22 $\mu\text{m}$ ).

## 2.2 Modelagem matemática

Existem níveis diferentes para os quais a dinâmica do processo de apoptose pode ser descrita. O processo de apoptose parece reproduzir dinamicamente o que ocorre no comprometimento da célula para se dividir. Esse processo, sugerem Palsson & Bhatia (2004), prossegue como de primeira ordem; logo, a apoptose de uma população de células  $X$  pode ser descrita por uma equação do tipo

$$\frac{dX}{dt} = -\alpha X \quad (1)$$

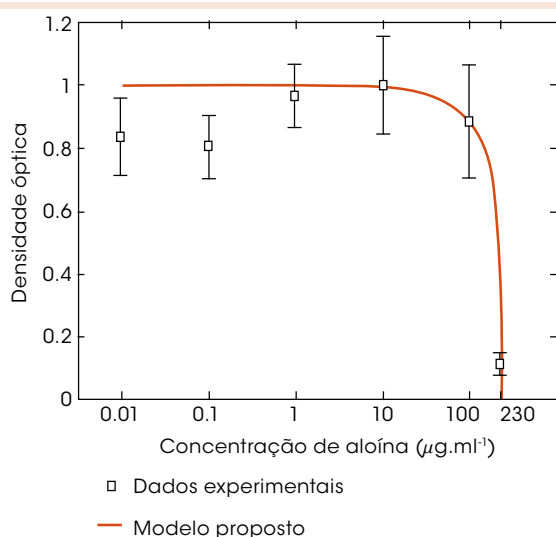
em que  $\alpha$  representa a velocidade específica de apoptose, ou morte celular programada. A morte celular específica pode ser decorrente de diversos fatores, especialmente da concentração  $c$  e do efector. Uma relação funcional em potencial entre a velocidade específica de apoptose e um efector pode ser expressa da seguinte forma:

$$\alpha(c) = \frac{\alpha_{\text{máx}} c}{K_m + c} \quad (2)$$

em que  $K_m$  é equivalente à constante de Michaelis, ou seja, o valor de concentração no qual a população celular é destruída em 50%.

### 3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos para os ensaios com aloína e o extrato do parênquima clorofiliano encontram-se, respectivamente, nas Figuras 2 e 3.

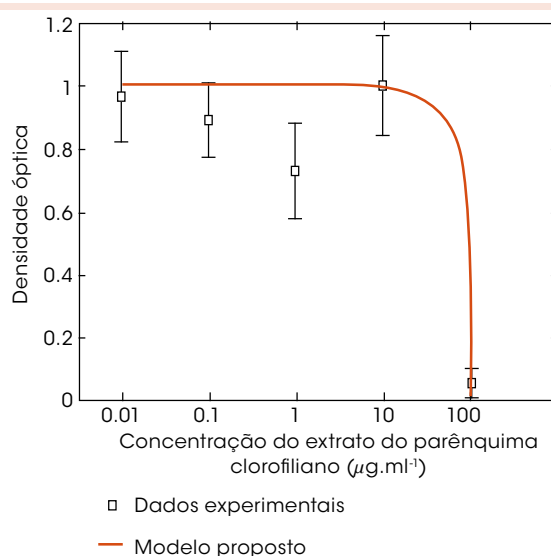


**Figura 2: Curva de morte celular em razão da concentração de aloína, após quarenta e oito horas de exposição ao efetor. Os dados experimentais representam médias de oito experimentos (poços) para cada condição de concentração**

Fonte: Os autores.

Tanto para o caso da toxicidade da aloína-padrão quanto para o extrato do parênquima clorofiliano de *A. Vera L*, observa-se queda brusca no número de células após determinada concentração crítica do efetor. A queda brusca no número de células viáveis está diretamente relacionada à concentração do efetor, mostrando que no intervalo que compreende concentrações de 100 µg.mL⁻¹ a 230 µg.mL⁻¹ para a aloína e de 10 µg.mL⁻¹ a 100 µg.mL⁻¹ para o extrato do parênquima clorofiliano, a viabilidade celular começa a diminuir, ou seja, o efetor passa a interferir na sobrevivência das células, causando a morte dessa linhagem tumoral de acordo com o aumento da concentração. Note-se que os dados de concentração estão graficados na escala

logarítmica. Até a concentração de cerca de 10 µg.mL⁻¹ praticamente não ocorreu morte celular. Contudo, é importante salientar que a densidade óptica registrada diz respeito ao número de células total, das quais uma fração é de células novas que se originaram das sementes. Ainda que inicialmente tenha se adicionado o mesmo número de células em cada poço de cultura, cada uma tem seu comportamento individualizado, ou seja, umas se multiplicam mais, outras menos, o que ocasiona variações importantes de densidade óptica para um conjunto de células que receberam o mesmo tratamento. Dessa forma, o processo de divisão celular, que ocorre, em média, em torno de vinte e quatro horas para a linhagem de melanoma utilizado, pode ter sido uma das causas da grande dispersão observada para os dados experimentais nos intervalos de 0,01 µg.mL⁻¹ a 10 µg.mL⁻¹ mostrados nas Figuras 2 e 3. Os desvios-padrão mostraram-se elevados, sobretudo para baixas concentrações do agente tóxico.



**Figura 3: Curva de morte celular em razão da concentração do extrato do parênquima clorofiliano, após quarenta e oito horas de exposição. Os dados experimentais representam médias de oito experimentos (poços) para cada condição de concentração**

Fonte: Os autores.



## 4 Modelo proposto

Com base nas observações experimentais e no modelo de morte celular por apoptose sugerido em Palsson & Bhatia (2004), foi desenvolvido o seguinte modelo para a morte celular provocada pela toxicidade de aloína e de outras substâncias presentes no extrato de *A. vera* L, ao final de quarenta e oito horas de exposição aos efetores:

$$\frac{dX}{dc} = \frac{\delta_{\max}}{c - K_{\delta}} \quad (3)$$

no qual  $\delta_{\max}$  é a variação máxima da população celular (isto é, morte celular) em razão da concentração do(s) efetor(es), expressa em densidade óptica relativa;  $K_{\delta}$  é uma singularidade do modelo ( $0 \leq c < K_{\delta}$ ) e representa a concentração de efetor na qual ocorre 100% de morte celular.

Utilizando-se como condição de contorno para a Equação 3 os valores de densidade óptica relativa igual à unidade (para o qual  $c = 0$ ), correspondentes a 2.500 células de melanoma vinte e quatro horas antes do início dos experimentos ( $t = 0$ ), obtém-se a seguinte solução analítica:

$$X = 1 + \left[ \ln \left( 1 - \frac{c}{K_{\delta}} \right) \right] \quad (4)$$

Os parâmetros mostrados na Tabela 1 foram obtidos da regressão não-linear, por meio do Método de Marquardt (CONSTANTINIDES & MOSTOUFI, 1999), a partir da Equação 3.

Para a obtenção dos parâmetros do modelo não se consideraram os três pontos experimentais iniciais, que foram tomados como constantes no intervalo 0,01 a 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Mesmo que as variações tenham sido consideráveis, elas se devem, principalmente, à dificuldade de obter o mesmo número de células ao final de quarenta e oito horas de ensaio.

Contudo, nessas baixas concentrações, não devem ser esperados efeitos tóxicos significativos produzidos pelos produtos de *A. vera* aqui testados. Ainda assim, a variação dos parâmetros é significativa, dado que o número de pontos de concentração utilizado foi relativamente pequeno. Isso explica, em parte, o grande desvio do parâmetro  $K_{\delta}$ .

**Tabela 1: Parâmetros de toxicidade celular obtidos da regressão não-linear do modelo proposto (Equação 3), considerando-se constantes os valores experimentais iniciais de densidade óptica até a concentração de 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$**

Efetor	Parâmetro de toxicidade	
	$\delta_{\max}$	$K_{\delta}$
Aloína-padrão	$0,205 \pm 0,009$	$233 \pm 9$
Extrato do parênquima	$0,15 \pm 0,09$	$100 \pm 58$

Obs.: Os valores são reportados pela média de oito experimentos  $\pm$  desvio-padrão.  
Fonte: Os autores.

Os dados da Tabela 2 representam a concentração de efetor para diferentes níveis de morte celular, expressos como porcentagem do número de células inicialmente presentes. Esses parâmetros, em conjunto com os do modelo matemático proposto, podem ser utilizados como referência ou critério para avaliar a toxicidade de diferentes efetores.

**Tabela 2: Valor crítico de concentração do efetor para morte celular determinado com base no modelo matemático proposto**

% Morte celular	Concentração de aloína, (A), $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Concentração do extrato, (E), $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Razão de toxicidade (E/A)
10	157	50	3,1
25	196	82	2,4
50	222	97	2,3
100	231	100	2,3

Obs.: Os valores de razão de toxicidade foram calculados dividindo-se as concentrações de aloína e de extrato.  
Fonte: Os autores.



Ao contrário do que se esperava, a toxicidade do extrato é superior à da aloína-padrão. Utilizando-se como critério os valores de  $K_0$  ou o porcentual de morte total, conclui-se que o extrato é 2,3 vezes mais tóxico do que a aloína-padrão utilizada. Isso é compatível com a idéia de que devem existir componentes mais tóxicos do que a aloína no extrato do parênquima clorofiliano de *A. vera*.

A atividade biológica da *A. vera*, neste caso a indução de morte celular, mais do que o efeito de um único composto em particular, parece ser decorrente de um sinergismo modulado de compostos bioativos. Isso está de acordo com o que é sugerido por Davis (1997).

É da tradição da medicina oriental o uso de materiais com atividade negativa e positiva para normalizar ou produzir um efeito biológico balanceado, formando um sistema especialmente imunorreativo ou imunomodulador (YAGI et al., 1986; SATO et al., 1990). É possível que, no caso do extrato de *A. vera*, alguns dos componentes promovam a proliferação celular, ao passo que outros induzem apoptose ou mesmo intoxicam as células de melanoma.

## 5 Considerações finais

Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular para a avaliação da ação antitumoral de compostos de *Aloe vera* L, em especial da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano, indicaram forte ação tóxica para células de melanoma de camundongo, linhagem B16-F10, em especial a partir de concentrações da ordem de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Pelo menos um dos compostos presentes no parênquima é mais promissor do que a aloína para a indução de morte celular dessa linhagem tumoral. O extrato apresentou toxicidade 2,3

vezes mais elevada do que a aloína-padrão, para morte celular total.

Um modelo matemático foi desenvolvido e testado para avaliar o efeito tóxico desses efetores (agentes antitumorais presentes na *A. vera* L). Foi possível associar aos parâmetros do modelo uma interpretação biológica útil para a comparação de diferentes agentes. Em particular, os dados de  $K_0$ , que representa a concentração de efetor na qual ocorrem 100% de morte celular, são importantes indicadores dos limites de viabilidade celular.

### In vitro study of the antitumoral effect of aloin in the culture of melanoma cells

Identification, extraction, isolation and characterization of plant-derived active molecules that modulate cell viability are of great clinical and pharmacological interest. Phytochemical tests have been used to demonstrate the presence of several compounds both from the primary and secondary metabolism of *Aloe vera* L. Aloin, an anthraquinone isolated from the chlorophyll parenchyma of *A. vera* L, is known for its biological activity. The antitumoral activity of aloin and the chlorophyll parenchyma extract was evaluated in vitro with the use of murine melanoma cell line B16F10. Cells incubated with 5%  $\text{CO}_2$  at 37°C were treated with different aloin and parenchyma extract concentrations. Both affected cellular stability, acting as modulators of tumoral cell viability. Experimental data were fitted to a developed mathematical model. From the fitting parameters we concluded that the chlorophyll parenchyma extract is 2.3 times more toxic to the cell than aloin.

**Key words:** *Aloe vera* L. Aloin. B16-F10 cell viability. Chlorophyll parenchyma extract. Mathematical modeling.

## Notas

- 1 Trabalho originalmente apresentado no XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAIFERM 2007, de 29 de julho a 01 de agosto, Curitiba/PR, 2007.





## Referências

- ARAÚJO, P. S.; SILVA, J. M. O. D.; NECKEL, C. A.; IANSEN, C.; OLTRAMARI, A. C.; PASSOS, R.; TIEPO, E.; BACH, D.B.; E MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa (Aloe vera – Liliaceae). *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n. 25, p. 54-57, 2002.
- CARMICHAEL J.; DEGRAFF W. G.; GAZDAR A. F.; MINN J. D.; MITCHELL J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, v. 47, p. 936- 942, 1987.
- CONSTANTINIDES, A.; MOSTOUFI, N. *Numerical methods for chemical engineers with MATLAB applications*. Ed. Prentice Hall, New Jersey, 1999.
- DAVIS, R.H. *Aloe vera – a scientific approach*. New York: Vantage Press, 1997.
- HAY, J.E. E HAYNES, L. J. The aloins. Part I. The structure of barbaloin. *J. Chem. Soc.*, v. 25, p. 3141-3147, 1956.
- HAYNES, L. J.; HENDERSON, J. I. E TYLER, J. M. C-glycosyl compounds. Part IV. The structure of homonataloin and the synthesis of nataloe-emodin. *J. Chem. Soc.*, v. 84, p. 4879-4885, 1960.
- KAWAI, K.; BEPPU, H.; KOIKA, T.; FUJITA, K. E MARUNAUCHI, T. Tissue culture of Aloe arborescens Miller var. natalensis Berger. *Phytotherapy Research*, v. 7, p. 55-510, 1993.
- KINTZIOS, E. S.; BARBERAKI, G. M. Plants and Cancer. In *Plants that Fight Cancer*, ed. Spiridon. Florida 2; 156-234, 2003.
- LULINSCKI, B. R. D.; KAPICA, C. Some Notes on Aloe Vera. *Interstitial Cystitis Network: Patient Handbook-Consumer Alerts*; may, 2003.
- MAPP, R. K.; MCCARTHY, T. J. The assessment of purgative principles in aloes. *Planta Medica*, n. 18, p. 361-365, 1970.
- PALSSON, B. O.; BHATIA, S. N. *Tissue Engineering*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, 2004.
- SATO, Y.; OHTA, S. E SHINODA, M. Studies on chemical protectors against radiation. Protection effects of Aloe arborescens on skin injury induced by x-irradiation. *Yakugaku Zasshi*, v. 110, p. 876-884, 1990.
- SYDISKIS, R. J.; OWEN, D. G.; LOHR, J. L.; ROSLER, K. H. E BLOMSTER, R. N. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, p. 2463-2466, 1991.
- YAGI, A.; NISHIMURA, H.; SHIDA, T. E NISHIOKA, I. Structure determination of polysaccharides in Aloe arborescens var. natalensis. *Planta Medica*, n. 52, p. 213-217, 1986.

Recebido em 10 set. 2007 / aprovado em 8 out. 2007

### Para referenciar este texto

BERTI, F. V; PÉRTILE, R. A. N; SIQUEIRA JUNIOR, J. M; VALLE, R. M. R. do; DIAS, P. F; PORTO, L. M. Estudo *in vitro* do efeito antitumoral da aloína em cultura de células de melanoma. *Exacta*, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 169-176, jan./jun. 2007.