

E**ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *PSYCHOTRIA PRUNIFOLIA* (RUBIACEAE) EM CÉLULAS TUMORAIS E NORMAIS *IN VITRO*****WANESSA CARVALHO PIRES****FRANCYELLI MARIANA DOS SANTOS MELLO****MARIANA PEDROSA BATISTA****FLÁVIA DE CASTRO PEREIRA****ALINY PEREIRA LIMA****CESAR AUGUSTO SAM TIAGO VILANOVA-COSTA**

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil

LUCILIA KATO

Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil

ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA-LACERDA

Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Caixa postal 131, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil; e-mail: silveiralacerda@gmail.com

15

RESUMO: A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo também na comunidade médica, desde que suas atividades biológicas, eficácia e segurança tenham sido investigadas cientificamente e comprovadas. Por isso, investigamos o potencial citotóxico do extrato bruto etanólico de *Psychotria prunifolia* em células tumorais e células normais, usadas como controle para as células tumorais. Para tal, foram utilizados dois testes independentes: MTT e azul de tripano. Os resultados sugerem que essa planta tem atividade citotóxica em células tumorais, embora esta atividade também tenha sido observada em células normais. Assim, torna-se necessário proceder a estudos mais detalhados, já que a planta se mostrou promissora no que diz respeito à atividade antitumoral.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade citotóxica, azul de tripano, MTT, *Psychotria prunifolia*.

STUDY OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF *PSYCHOTRIA PRUNIFOLIA* (RUBIACEAE) CRUDE ETHANOLIC EXTRACT IN NORMAL AND TUMOR CELLS *IN VITRO*

ABSTRACT: The use of medicinal plants has become a widely accepted therapeutic alternative by the population and it has been also growing in the medical community, provided that their biological activities, efficacy, and safety have been scientifically investigated and proved. Therefore we investigated the cytotoxic potential of the crude ethanolic extract of *Psychotria prunifolia* in tumor and normal cells, used as the control for tumor cells. To do this, we used two independent tests: the MTT and trypan blue. The results suggest that this plant presents cytotoxic activity in tumor cells, although this activity could also be observed in normal cells. Thus, it is necessary to perform more detailed studies, since the plant has proved promising with regard to antitumor activity.

KEY WORDS: Cytotoxic activity, trypan blue, MTT, *Psychotria prunifolia*.

INTRODUÇÃO

O uso da medicina tradicional e de plantas medicinais tem sido amplamente documentado na maioria dos países em desenvolvimento, a fim de ajudar a satisfazer algumas de suas necessidades de cuidados primários de saúde. No campo da atividade antineoplásica, tem sido demonstrada correlação entre a atividade biológica e a utilização tradicional do medicamento (WHO, 2002).

A fitoterapia é uma ciência que visa o tratamento de algumas doenças com o emprego de ervas e plantas que apresentam propriedades curativas. Esse fato desperta o interesse pelo estudo fotoquímico e farmacológico das plantas, especialmente daquelas existentes no Cerrado, cuja análise pode conduzir a metabólitos secundários, que podem apresentar maior ou menor atividade tóxica (Fonseca & Pereira, 2004).

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo também na comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança (Noldin et al., 2003).

Paralelamente, a utilização de plantas medicinais para obtenção de drogas antitumorais tem sido um importante caminho para a descoberta de novas aplicações clínicas baseadas nos estudos dos metabólitos secundários e seus derivados (Balunas & Kinghorn, 2005). O Brasil possui um número muito grande de espécies vegetais nativas que são consideradas medicinais (Barbosa-Filho et al., 2005; Brandão et al., 2006; Lima et al., 2006; Mors et al., 2000).

A família Rubiaceae compreende espécies arbóreas e arbustivas, que ocorrem em vários extratos de florestas tropicais (Burger & Taylor, 1993), possui distribuição cosmopolita, concentrada nos trópicos, incluindo aproximadamente 550 gêneros e 9.000 espécies. No Brasil, ocorrem cerca de 130 gêneros e 1.500 espécies, correspondendo a uma das principais famílias de nossa flora e ocorrendo como importante elemento em quase todas as formações naturais (Souza & Lozenzi, 2005).

Segundo Robbrecht (1988), a família Rubiaceae pode ser dividida em quatro subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae, Ixoroideae e Artirheoideae. As espécies pertencentes à subfamília Rubioideae estão distribuídas em 15 tribos, entre as quais a maior é Psychotrieae. Essa tribo é formada por 50 gêneros, alguns deles com delimitação incerta e controversa, como é o caso de *Psychotria* e *Palicourea* (Libot et al., 1987).

O gênero *Psychotria* é comumente representado por arbustos, pequenas árvores, ervas e, raramente, por epífitas. É um gênero pantropical e subtropical, encontrado nos dois hemisférios. É comum no sub-bosque de matas tropicais (Hamilton, 1990; Taylor, 1996). Apresenta aproximadamente 2.000 espécies, sendo o maior gênero da tribo *Psychotrieae* e da família Rubiaceae, bem como das espécies lenhosas (Davis et al., 2001).

Psychotria prunifolia pertence ao grupo das dicotiledôneas, natural do Cerrado e rica em alcaloides e iridoides, os quais apresentam atividade terapêutica já comprovada (Barroso, 1991). Na literatura, há descrição de estudos fitoquímicos de diversas espécies desse gênero, com isolamento majoritário de alcaloides e iridoides (Muhammad et al., 2003). Entretanto, até o presente momento, não foram encontrados estudos farmacológicos, toxicológicos e de atividade citotóxica acerca da espécie *P. prunifolia*.

No mundo, cerca de 1.000 espécies de plantas apresentam propriedades antitumorais significativas (Mukherjee et al., 2001). Embora o Brasil apresente a maior diversidade vegetal do mundo e de 25% do faturamento da indústria farmacêutica nacional ser originado de medicamentos derivados de plantas, apenas 8% das espécies da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Guerra & Nodari, 2004).

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos citotóxicos do extrato bruto etanólico de *P. prunifolia* em células tumorais e células normais (controle), por meio do teste de viabilidade celular (colorimétrico de redução MTT) e do teste de citotoxicidade celular (azul de tripano).

METODOLOGIA

Psychotria prunifolia

O material vegetal (folhas e caule) de *P. prunifolia* foi coletado em novembro de 2007, no Bosque St. Hilaire, da Universidade Federal de Goiás (UFG). A exsicata do material contendo raiz, caule e folhas foi depositada no Herbário da UFG para identificação botânica.

EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *PSYCHOTRIA PRUNIFOLIA*

As folhas e raízes de *P. prunifolia* foram secas, moídas e submetidas à extração com etanol à temperatura ambiente. O extrato bruto etanólico da folha (EBEfPp) e o extrato bruto etanólico da raiz (EBEcPp) (35 g) foram preparados e fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química (UFG).

PREPARO DA DROGA TESTE

Os EBEfPp e EBecPp foram diluídos em meio de cultura celular RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, Grand Island, NY, EUA) e colocados em aparelho de ultrassom (Branson, Danbury, CT, EUA) por um período de 50 min. O EBEfPp e o EBecPp foram testados nas concentrações de 0,001 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹.

CULTURA DE CÉLULAS

As linhagens de células de fibroblasto humano (HFF-1) (ATCC SCRC-1041-185), leucemia mieloide K-562 (ATCC CCL-242) e Sarcoma-180 (S-180) (ATCC CCL-8) foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

As células foram cultivadas em meio de cultura celular RPMI-1640 (pH 7,2-7,4) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 0,1% de penicilina (10.000 UI/mL)/estrep-

tomicina (10 mg.mL⁻¹) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). As células de fibroblasto humano (HFF-1) foram rotineiramente subcultivadas usando 2,5 g.L⁻¹ de solução de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), pois são células aderentes à garrafa de cultivo celular. As células foram tratadas com 3 mL de tripsina e incubadas em estufa contendo 95% de ar e 5% CO₂ a 37°C por 5 min. Após o período de incubação, 5 mL de meio de cultura foram acrescentados para que se promovesse a inativação da tripsina.

PREPARO DO CONTROLE POSITIVO

Como controle positivo, foi utilizado o fármaco antineoplásico ciclofosfamida (Baxter, Deerfield, IL, EUA), com amplo espectro de ação antitumoral (Craig & Stitzel, 1996). A ciclofosfamida foi diluída em meio de cultura celular RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), sem SFB, utilizado na concentração de 5 mg. mL⁻¹.

AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT

Para avaliar a viabilidade celular após o tratamento com EBecPp e EBEfPp, foi utilizado o método colorimétrico do MTT. O princípio deste método, descrito por Mosmann (1983), consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Para o teste do MTT, 2 x 10⁵ células das linhagens utilizadas foram semeadas em microplacas de 96 poços em ausência ou presença de EBecPp e EBEfPp nas concentrações de 0,001 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹ e incubadas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. Ao final do período de incubação, foram adicionados aos poços de cultivo celular 10 µL de MTT na concentração de 5 mg.mL⁻¹ e, após 4 h de incubação, foram acrescentados 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% diluído em HCL 0,01N. A quantificação da densidade óptica foi medida em espectrofotômetro (Awareness Technology INE, Stat Fax 2100). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Absorbância do tratamento}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

A curva dose resposta foi determinada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRIPANO

A avaliação da viabilidade da célula na presença do EBECpP e EBEPp foi realizada segundo o método de exclusão de azul de tripano (McAteer & Davis, 1994 apud Ribeiro et al., 2003). O experimento foi incubado por 24 h, em triplicata. Após esse período de incubação, uma alíquota de 20 μL da suspensão de células foi retirada e diluída em azul de tripano 0,04% (Sigma, Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA) e as células foram contadas em câmara de Neubauer. As células viáveis, que excluíram o corante, apresentaram aspecto translúcido, enquanto as células mortas apresentaram coloração azulada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados, foram utilizados a análise de variância (ANOVA), o teste de comparação múltipla de Tukey, com significância de $p < 0,05$, para a comparação entre os grupos, e o teste de comparação múltipla de Dunnett, com significância de $p < 0,05$, para comparação dos grupos tratados com o grupo controle negativo, utilizando o Software GraphPad-Prism V3.02. Para todos os grupos, consideraram-se estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o potencial citotóxico *in vitro* do EBECpP e EBEPp de *P. prunifolia* em células tumorais e células normais.

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DO EBECpP E EBEPp SOBRE A LINHAGEM DE K-562

No ensaio de MTT, o EBEPp não apresentou atividade citotóxica significativa sobre

a linhagem leucêmica mieloide crônica (K-562) nas concentrações testadas, sendo o percentual de viabilidade celular de 89%, 91%, 94% e 78% para as concentrações de 0,001 mg.mL^{-1} , 0,01 mg.mL^{-1} , 0,1 mg.mL^{-1} e 1 mg.mL^{-1} , respectivamente (Figura 1). A concentração de 1 mg.mL^{-1} apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,001$), de acordo com ANOVA seguido dos testes de Tukey e Dunnet. Entretanto, não consideramos significativo o resultado de 22% de citotoxicidade, pois, além de ser baixo nível de citotoxicidade, a concentração de 1 mg.mL^{-1} é muito alta e não utilizada em nenhum tipo de fármaco descrito na literatura.

O teste de redução do MTT avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase de reduzir o substrato MTT a cristais de formazan na mitocôndria da célula (Mosmann, 1983). Por outro lado, o teste de exclusão do corante azul de tripano permite a avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática (Barile, 1994). Portanto, mesmo quando a membrana é lisada por um agente citotóxico, as organelas citoplasmáticas ainda podem manter sua atividade fisiológica e, não necessariamente, os dois testes aqui utilizados devem fornecer o mesmo resultado, pois são testes com princípios diferentes.

No ensaio com o método azul de tripano, a viabilidade celular foi de 91%, 90%, 95% e 64% para as concentrações de 0,001 mg.mL^{-1} , 0,01 mg.mL^{-1} , 0,1 mg.mL^{-1} e 1 mg.mL^{-1} de EBEPp, respectivamente, confirmando que este não apresentou atividade citotóxica estatisticamente significativa em células K-562.

Na Figura 2, observa-se que o EBECpP causou resposta dose-dependente no teste MTT sobre a linhagem K-562, mas não apresentou atividade citotóxica significativa nas concentrações testadas, sendo o percentual de viabilidade celular semelhante aos encontrados para EBEPp, com 99%, 97%, 92% e 73% para as concentrações de 0,001 mg.mL^{-1} , 0,01 mg.mL^{-1} , 0,1 mg.mL^{-1} e 1 mg.mL^{-1} , respectivamente. A concentração de 1 mg.mL^{-1} apresentou diferença significativa

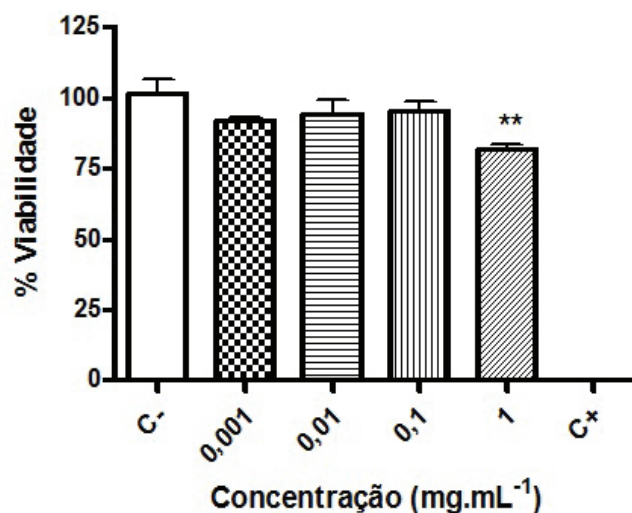


Figura 1 – Viabilidade celular de EBEfPp (mg.mL⁻¹) sobre a linhagem tumoral K-562; controle negativo – meio de cultura celular RPMI-1640 completo; controle positivo – ciclofosfamida (5 mg.mL⁻¹). Resultados obtidos a partir de três experimentos realizados em triplicata; ** diferença estatística no nível de $p < 0,001$ (ANOVA seguido dos testes de Tukey e Dunnet).

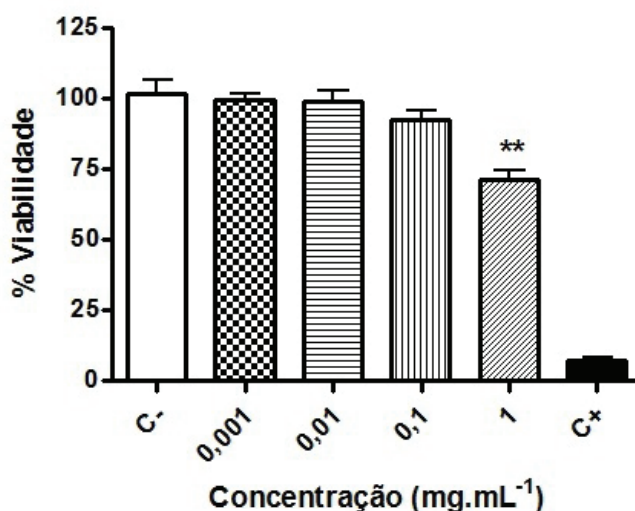


Figura 2 – Viabilidade celular de EBECpP (mg.mL⁻¹) sobre a linhagem tumoral K-562; controle negativo – meio de cultura celular RPMI-1640 completo; controle positivo – ciclofosfamida (5 mg.mL⁻¹). Resultados obtidos a partir de três experimentos realizados em triplicata; ** diferença estatística no nível de $p < 0,001$ (ANOVA seguido dos testes de Tukey e Dunnet).

quando comparada com o controle negativo ($p < 0,001$), mas, como ocorreu com EBEfPp, esta concentração é alta para ser utilizada como possível fármaco.

No ensaio com azul de tripano, a viabilidade celular foi de 93%, 93%, 86% e 72%, nas concentrações de 0,001 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹ de EBECpP, respectivamente, confirmando que não houve atividade citotóxica significativa em nenhuma delas.

Para Bruneton (2001), a distribuição de um amplo grupo de alcaloides monoterpênicos está praticamente ligada a três famílias: Asponyaceae, Loganiaceae e Rubiaceae. A diversidade estrutural desse grupo conta com mais de 2.000 compostos diferentes. Menos de 10% dos gêneros que compõem a família Rubiaceae, pertencentes a tribos mais primitivas das subfamílias Rubioideae (Psychotrieae: Chefhaelis) e Cinchonoideae, elaboram alcaloides a partir de uma unidade monoterpênica.

Na literatura, são descritas várias atividades para extratos e alcaloides isolados de espécies de *Psychotria*, entre as quais estão as atividades antimicrobiana e analgésica. Em estudo realizado por Farias (2008), o extrato N-butanólico de alcaloides de *Psychotria myriantha*, além de seus alcaloides isolados, apresentou atividade inibidora da migração de leucócitos, sugerindo efeito anti-inflamatório e capacidade de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase.

Extratos etanólicos de *Psychotria brachyceras*, *Psychotria lelocarpa*, *Psychotria myriantha* e *Psychotria suterelia*, nas doses de 100 mg.kg⁻¹, 350 mg.kg⁻¹ e 500 mg.kg⁻¹, apresentaram atividade analgésica não dose-dependente e não reversível por naloxona, sugerindo ação inespecífica. Todos os extratos testados apresentaram efeito hipotérmico (Elizabethsky et al., 1995). Em estudo posterior, com extrato de alcaloides totais de *P. suterelia* e seu alcaloide isolado ilalosídeo, Santos (1999) verificou que a espécie não apresentou efeito analgésico. Porém, tanto o extrato (100 mg.kg⁻¹) como o alcaloide (30 mg.kg⁻¹) apresentaram diminuição da atividade locomotora. Na dose de 300 mg.kg⁻¹, houve morte precedida por convulsões em 66% dos animais testados.

Os resultados preliminares obtidos no presente trabalho não descartam em definitivo a utilização de *P. prunifolia*. Contudo, são

necessários novos ensaios para detectar a possível ação antitumoral ou citotóxica de seus constituintes químicos em outras linhagens de células tumorais, pois estudos conclusivos relacionados à investigação da composição fitoquímica desta espécie ainda não foram realizados. Sabe-se que a presença, a concentração e o tipo de compostos químicos presentes em uma planta podem sofrer influência de diversos fatores ambientais. Na literatura, há relatos da ação do extrato de outras espécies de *Psychotria* sobre células tumorais em concentrações maiores. No presente estudo, a maior concentração (1 mg.mL⁻¹) causou citotoxicidade baixa, mas relevante, equivalente a 27% para EBECpP e 22% para EBEPp.

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DO EBECpP SOBRE A LINHAGEM HFF-1

Os testes citotóxicos e de viabilidade celular, realizados com o EBECpP sobre a linhagem HFF-1 promoveram a redução da viabilidade celular (Figura 3), resultando em citotoxicidade relevante, de 59%, 28%, 18% e 7% para as concentrações de 1 mg.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹ e 0,001 mg.mL⁻¹, respectivamente. A ação do EBECpP foi dose-dependente para o teste de MTT e as concentrações não apresentaram diferença significativa entre si e nem em relação ao controle

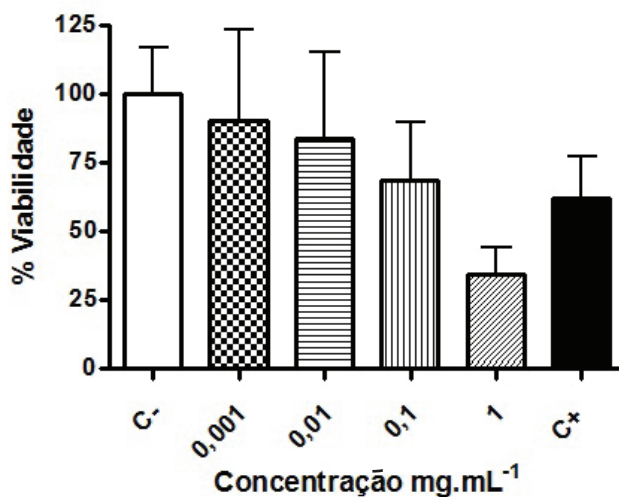


Figura 3 – Viabilidade celular de EBECpP (mg.mL⁻¹) sobre a linhagem tumoral HFF-1; controle negativo – meio de cultura celular RPMI-1640 completo; controle positivo – ciclofosfamida (5 mg.mL⁻¹). Resultados obtidos a partir de dois experimentos realizados em triplicata.

negativo. Quanto ao ensaio com azul de tripano, a viabilidade celular foi maior, sendo de 74%, 80%, 92% e 94% nas concentrações de 0,001 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a atividade citotóxica de extrato etanólico de caule para nenhum gênero de *Psychotria* em relação à linhagem de células normais. Entretanto, há indícios de que plantas de outros gêneros apresentam atividade citotóxica tanto em células normais quanto em células tumorais.

De acordo com Pessoa et al. (1999), além da jatofona ter apresentado efeito citotóxico sobre as linhagens de leucemia humana (CCRF-CEM e HL-60), também promoveu elevada citotoxicidade sobre a linhagem de fibroblasto humano (CCD-922), tendo sido 50% da ação observada para as concentrações de 0,1 µg.mL⁻¹ e 0,2 µg.mL⁻¹.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EBECpP E EBEfPp SOBRE A LINHAGEM S-180

Na avaliação do EBECpP em células tumorais S-180 (Figura 4), houve inibição do crescimento das células na concentração de 1 mg.mL⁻¹ e a viabilidade celular foi de 95%, 91%, 97% e 64% nas concentrações de 0,001 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹, respectivamente.

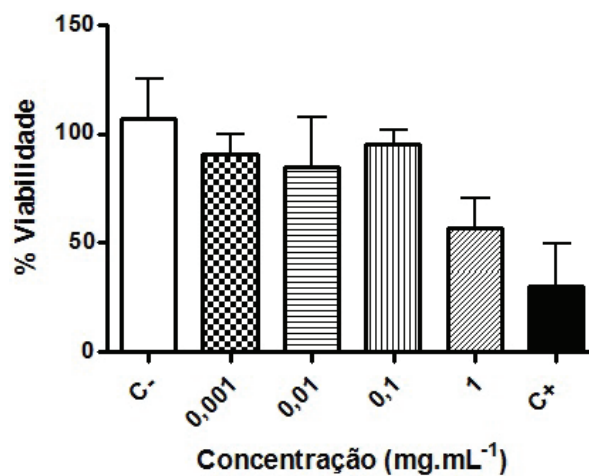


Figura 4 – Viabilidade celular de EBECpP (mg.mL⁻¹) sobre a linhagem tumoral S-180; controle negativo – meio de cultura celular RPMI-1640 completo; controle positivo – ciclofosfamida (5 mg.mL⁻¹). Resultados obtidos a partir de dois experimentos realizados em triplicata.

Na Figura 5, observa-se que, em decorrência da ação do EBEfPp sobre a linhagem S-180, a viabilidade celular foi de 86%, 92%, 93% e 92% nas concentrações de 1 mg.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹, 0,01 mg.mL⁻¹ e 0,001 mg.mL⁻¹, respectivamente. As concentrações não apresentaram diferença significativa entre si e nem em relação ao controle negativo.

Há vários trabalhos mostrando que extratos de plantas apresentam efeito inibitório no crescimento tumoral de células S-180. Como exemplo, pode-se mencionar *Kalanchoe brasiliensis*, espécie testada por Machado e Melo-Junior (2009), que reduziu a massa tumoral em 52% em camundongos.

Inúmeros são os registros de estudos realizados *in vitro* e *in vivo* utilizando células S-180. Em vários deles, a concentração em que há uma resposta antitumoral positiva é de 50 mg.kg⁻¹ ou acima desta (Aguiar, 2006). Assim, faz-se necessário elaborar novos estudos com aumento do tempo de exposição ao extrato para a obtenção de resultados minuciosos e satisfatórios tanto para células tumorais como normais.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que os extratos brutos etanólicos de folha e caule de *P. prunifolia* não apresentaram atividade citotóxica significativa no teste de MTT para as linhagens

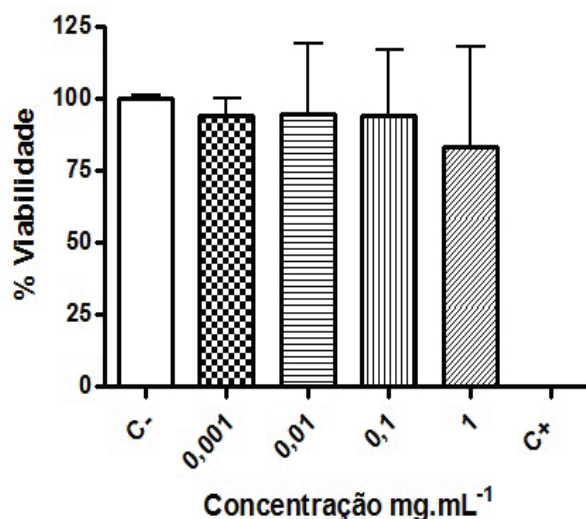


Figura 5 – Viabilidade celular de EBEfPp (mg.mL⁻¹) sobre a linhagem tumoral S-180; controle negativo – meio de cultura celular RPMI-1640 completo; controle positivo – ciclofosfamida (5 mg.mL⁻¹). Resultados obtidos a partir de dois experimentos realizados em triplicata.

K-562 e S-180. Observou-se que para a linhagem K-562 obteve-se diferença significativa na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Porém, o índice de citotoxicidade detectado foi baixo e a concentração do extrato em que ele ocorreu foi muito alta para ser utilizada como possível fármaco em linhagens celulares.

Na linhagem de células normais HFF-1, houve citotoxicidade em todas as concentrações no teste MTT, diferindo do teste com azul de tripano, que apresentou maior percentual de células viáveis.

Outros estudos comprobatórios são necessários a fim de certificar a atividade citotóxica dos extratos brutos etanólicos de folha e caule de *P. prunifolia* sobre linhagem de células normais. Também devem ser testados os alcaloides isolados dessa planta para estudar sua ação citotóxica em células tumorais e normais e seu possível uso como nova molécula com atividade antitumoral.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, J. S.** 2006. Atividades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e antiinflamatória de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Balunas, M. J. & A. D. Kinghorn.** 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78: 431-441.
- Barbosa-Filho, J. M., T. H. C. Vasconcelos, A. A. Alencar, L. M. Batista, R. A. G. Oliveira, D. N. Guedes, H. S. Falcão, M. D. Moura, M. F. F. M. Diniz & J. Modesto-Filho.** 2005. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15: 392-413.
- Barile, F. A.** 1994. *In vitro* cytotoxicology. CRC Press, New York, 96 pp.
- Barroso, G. M.** 1991. Sistemática de Angiospermas do Brasil. v.3. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 326 pp.
- Brandão, M. G. L., G. P. Cosenza, R. A. Moreira & R. L. M. Monte-Mor.** 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16: 408-420.
- Bruneton, J.** 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2^a ed. Editorial Acríbia, Zaragoza, 1100 pp.
- Burger, W. C. & C. M. Taylor.** 1993. Flora costaricensis. *Fieldiana* 33: 1-333.
- Craig, C. R. & R. E. Stitzel.** 1996. Farmacologia moderna. 4^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Davis, A. P., D. Bridson, C. Jarvis & R. Govaerts.** 2001. The typification and characterization of the genus *Psychotria* L. (Rubiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 135: 35-42.

- Santos, L. V.** 1999. *Psychotria suterella* Müell. Arg.: caracterização dos alcalóides, análise farmacológica e cultivo *in vitro* de calos e raízes. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
- Elizabethsky, E., T. A. Amador, R. R. Albuquerque, D. S. Nunes & A. C. Carvalho.** 1995. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Mull. Arg. alkaloids. *J. Ethnopharmacol.* 48: 77-83.
- Farias, F. M.** 2008. *Psychotria myriantha* Müll Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades anti-quimiotóxica e sobre o sistema nervoso central. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Disponível em: <<http://www.biblioteca-digital.ufrgs.br/da.php?nrb=000578863&loc=2007&l=80735f4f6cd3ee47>>.
- Fonseca, C. A. & D. G. Pereira,** 2004. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Informa* 16: 7-8.
- Guerra, M. P. & R. O. Nodari.** 2004. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos, p. 13-28. *In:* C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, & P. R. Petrovick (Orgs.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed. Porto Alegre, Florianópolis, UFSC, UFRGS.
- Hamilton, C. W.** 1990. Variation on a distylous theme in Mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Mem. NY Bot. Garden* 55: 62-75.
- Libot, F., C. Miet, N. Kunesch, J. E. Poisson, J. Pusset & T. Sévenet.** 1987. Rubiacées d'Océanie: Alcaloïdes de *Psychotria oleoides* de Nouvelle – Calédonie et de *Calycodrendon milnei* du Vanatu (Nouvelles-Hébrides). *J. Nat. Prod.* 50: 468-473.
- Lima, M. R. F., C. P. A. Ximenes, J. S. Luna & A. E. G. Santana.** 2006. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16: 300-306.
- Machado, M. C. F. P. & Melo-Junior, M. R.** 2009. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. *Rev. Eletr. Farm.* 6: 1-6.
- Mors W. B., C. T. Rizzini, N. A. Pereira & R. A. Defilippis.** 2000. Medicinal plants of Brazil. Reference Publications, Michigan, 501 p.
- Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Mukherjee, A. K., S. Basu, N. Sarkar & A. C. Ghosh.** 2001. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr. Med. Chem.* 8: 1467-1486.
- Muhammad, J., D. C. Dunbar, S. I. Khan, B. L. Tekwani, E. Bedir, S. Takamatsu, D. Ferreira & L. A. Walker.** 2003. Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. *J. Nat. Prod.* 66: 962-967.
- Noldin, V. F., V. Cechinel Filho, F. D. Monache, J. C. Benassi, I. L. Christmann, R. C. Pedrosa & R. A. Yunes.** 2003. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. *Quim. Nova.* 26: 331-334.
- Pessoa, C. O., M. H. G. Faria, E. Sant'anna, A. Leyva, C. Valle & M. M. Filho.** 1999. Investigação das atividades citotóxica e antitumoral da jatrofona. *Pesq. Méd.* 2: 75-78.
- Ribeiro, L. R., D. M. F. Salvadori & E. K. Marques.** 2003. Mutagênese ambiental. Editora da ULBRA, Canoas, 356 p.
- Robbrecht, E.** 1988. Tropical woody Rubiaceae. *Opera Bot. Belg.* 1: 1-271.
- Souza C. V. & H. Lorenzi.** 2005. Botânica sistemática. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 640 p.
- Taylor, C. M.** 1996. Overview of Psychotrieae (Rubiaceae) in the Neotropics. *Opera Bot. Belg.* 7: 261-270.
- WHO. World Health Organization.** 2002. National cancer control programmes: policies and managerial guidelines. 2nd ed. Geneva, 180 p.

Recebido em: 18/V/2010

Aceito em: 5/X/2011

