[Tocotrienol 70%: Avaliação de parâmetros de reprodutibilidade e segurança in vitro]

Palavras-Chave: [tocotrienol; padronização; Bixa orellana]

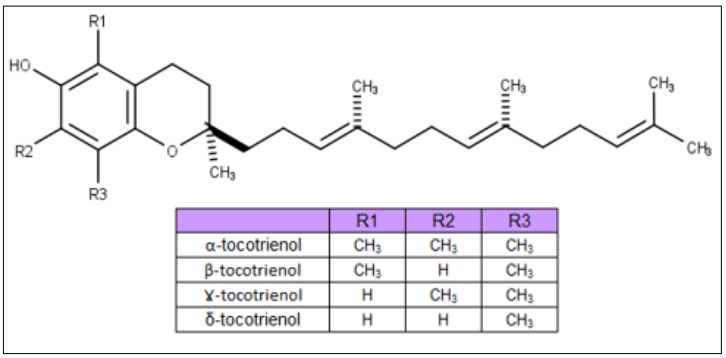
Autores/as:
Francisco Mastrobuono Cordeiro de Almeida [UNICAMP]
Profª Drª Mary Ann Foglio [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

A descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos continuam a ser um desafio, com custos elevados em pesquisa e desenvolvimento. Apesar dos principais avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos no tratamento de feridas, câncer, dor e inflamação, as terapias atuais são usualmente insuficientes por possuírem efeitos colaterais severos ou eficácia limitada. Por esta razão, a identificação dos mecanismos de ação, a busca por novas moléculas que sejam eficazes aliados a menos efeitos adversos, torna-se extremamente necessária para as possíveis aplicações [1]. Segundo Newman & Cragg[2], a estimativa de drogas provenientes de produtos naturais nos últimos anos é de cerca de 60%. A *Bixa orellana* L., também conhecida como urucum, é uma planta arbórea que possui em suas sementes mais de 73 componentes identificados. Da espécie se extrai um corante natural e, em alguns processos são gerados subprodutos, da fração de insaponificáveis, fornecendo uma fração enriquecido em geranilgeraniol e outra em tocotrienois. As frações de geranilgeraniol e tocotrienol tem descrito importantes atividades farmacológicas, tais como atividade antitumoral, neuroprotetivas, antimicrobianas e anti-inflamatórias. O objetivo desta proposta é avaliar a estabilidade da fração de tocotrienol 70% resultante do processo e concomitantemente identificar a composição dos 30% de componentes desconhecidos dessa fração e sua citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas para aplicação como ingrediente ativo para a indústria farmacêutica. Os resultados fornecerão dados para a padronização do produto determinando parâmetros para o controle de qualidade deste insumo.

METODOLOGIA:

O acesso ao uso do patrimônio genético esta protocolado na SISGEN sob número XXXXX.



	R1	R2	R3
α-tocotrienol	CH_3	CH_3	CH_3
β-tocotrienol	CH_3	H	CH_3
ɣ-tocotrienol	H	CH_3	CH_3
δ-tocotrienol	H	H	CH_3

Figura 1: Estrutura dos Isômeros do Tocotrienol

A fração de tocotrienol, objeto desta proposta, é proveniente do resíduo de extração de bixina de *Bixa orellana* produzidas através da colaboração com Dr. Paulo do projeto FAPESP (#2018/25761-8) do Instituto de Tecnologia de Alimentos em Campinas. (Carvalho, P., BR 102015029422-A2, deposito em 19/07/2016).

Foram utilizados métodos cromatográficos preparativos e analiticoas para monitoramento, fracionamento e identificação das frações separadas a partir da amostra denominada tocotrienol 70%.

A atividade antiproliferativa das amostras foi. Foram avaliadas linhagens de MCF-7 (mama) realizada segundo o protocolo descrito por Monks et al.(1991). As células dispostas em placas de 96 compartimentos (100 µL/mL de suspensão celular, densidade de inoculação: Tabela 1) serão expostas a quatro concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, em meio completo) de cada amostra, previamente diluída em dimetilsulfóxido (100mg/mL, solução estoque), e incubadas por 48h. Uma placa controle (T0) será fixada com ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) no momento da adição das amostras. Com base em resultados anteriores, sabe-se que a concentração final de DMSO (<0,25%) não interfere na viabilidade celular. Após o período de exposição, as células tratadas serão fixadas com TCA e a proliferação celular será determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo proteico celular usando o corante sulforrodamina B. A partir das leituras espectrofotométricas (T1 e T0), será calculado a proliferação celular para cada concentração de amostra testada. Esses resultados serão expressos em curvas de proliferação celular de cada linhagem em função da concentração da amostra. A partir desses gráficos, será calculada uma das três concentrações efetivas, a saber, GI_{50} (concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular), TGI (concentração necessária para inibição total de proliferação celular) e LC_{50} (concentração necessária para promover 50% de morte celular), através de regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software ORIGIN 8.0® (OriginLab Corporation (as linhagens avaliadas estão descritas na Tabela 01 em resultados).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Como primeiras etapas no desenvolvimento da parte experimental do projeto, foram realizadas cinco colunas filtrantes, para a separação dos componentes correspondente 30% residuais da amostra contendo 70% de tocotrienol. Na figura 2 abaixo, foram representadas todas as cinco colunas filtrantes, com as respectivas CCDs utilizadas para monitorar o

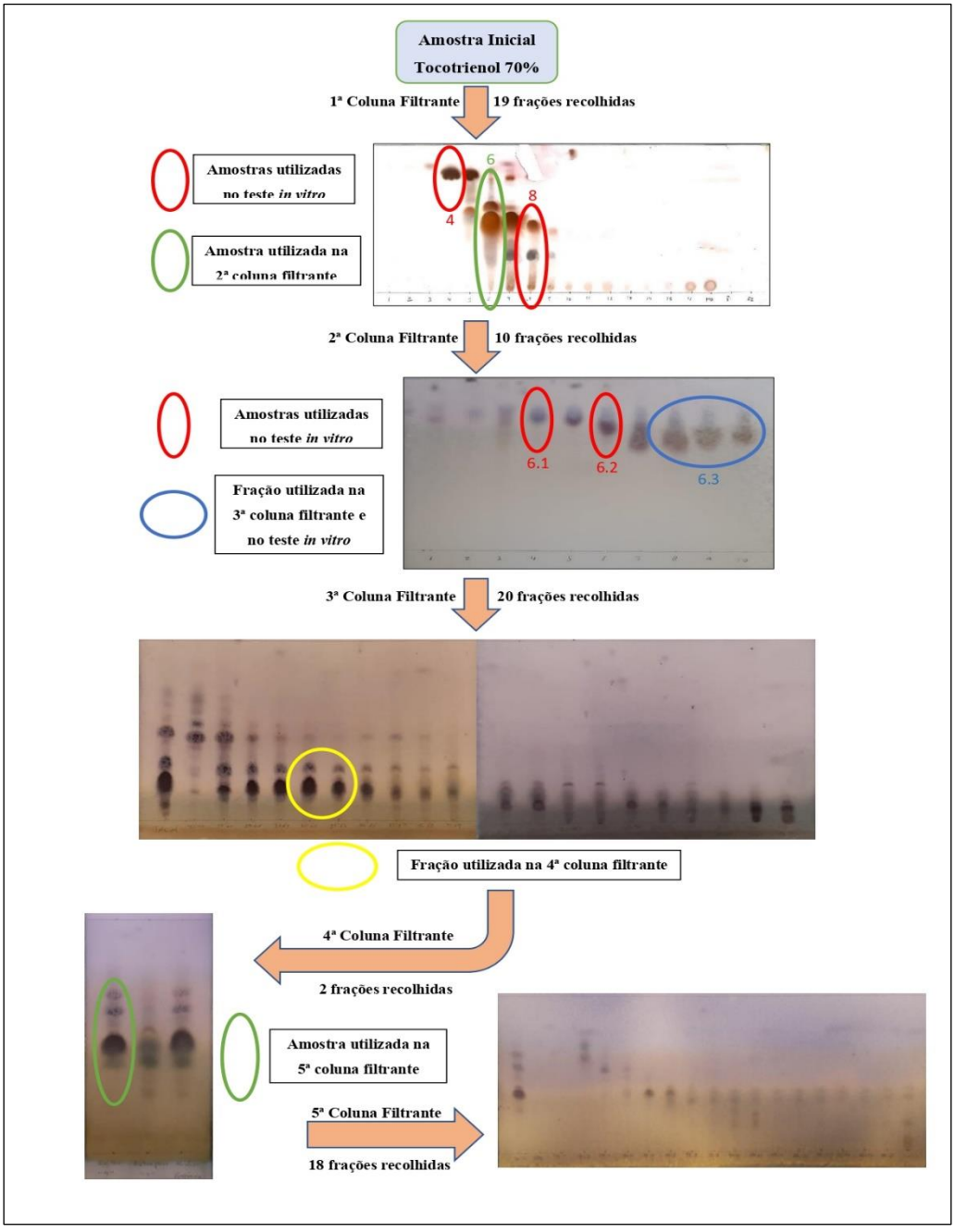


Figura 2: Representação das colunas cromatográficas e das CCDs realizadas durante a parte experimental

processo; também, foram destacadas as frações mais importantes de cada uma, inclusive àquelas utilizadas nos testes *in vitro*.

Com a utilização das frações 4,8,6.1,6.2 e 6.3 mostradas no fluxograma, foi realizada então, a análise de citotoxicidade *in vitro*. Os resultados referentes ao GI_{50} (quantidade necessária para inibição de 50% do crescimento celular) estão representados na Tabela 1 ao lado, juntamente das linhagens à que foram expostas as frações. Analisando o resultado, se observa que a fração 6.3 foi a única que apresentou bons resultados em todas as linhagens tumorais utilizadas, com ênfase na linhagem de glioma U251. Desta forma, mais um estudo foi realizado para a fração 6.3: um gráfico referente à concentração das amostras vs crescimento celular (Tabela 2). Pelo gráfico, se observa uma indução de morte celular em todas as linhagens em maiores concentrações; além disso, com exceção de duas linhagens (H460 e K562), a inibição do crescimento foi de cerca de 100% em todas as demais linhagens, com altas concentrações.

	U251	MCF-7	786-0	H460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	K562	HaCaT
Dox	<0,015	0,063	0,043	0,09	0,06	0,07	0,21	0,18	0,023
4	16,2	71,5	15,1	100,4	17,4	19,2	>150	0,4	23
6.1	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150
6.2	>150	>150	>150	>150	>150	>150	>150	9,6	>150
6.3	13,5	15,6	15	19,3	18,4	16,4	19,8	6,7	16
8	16,8	10	35	>150	>150	87,5	>150	0,9	6

Linhagens tumorais humanas: U251 (glioblastoma); MCF-7 (mama); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (colo retal); K562 (leucemia).
Linhagem humana não tumoral: HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados)

Tabela 1: Valores de GI_{50} das frações utilizadas em oito linhagens humanas tumorais e uma humana não tumoral.

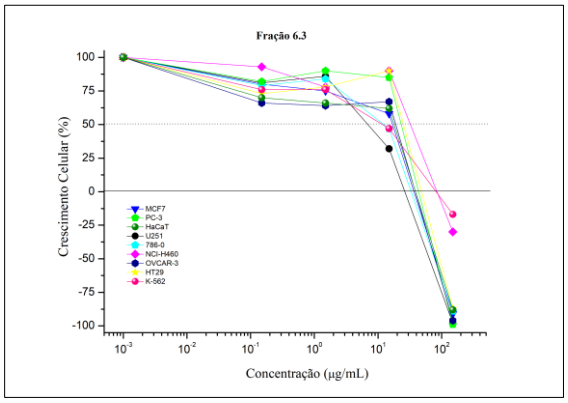
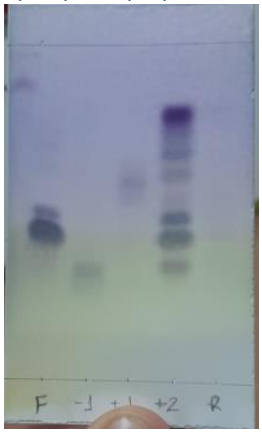


Gráfico 1: Concentração das amostras x crescimento celular de diversas linhagens celulares após 48h de exposição

Com o resultado da última coluna de separação, todas as frações foram separadas em quatro partes no total. As que continham a maior porção de tocotrienol segundo a CCD realizada e permaneceram inalteradas foram 95:5 e 94:6 (Hexano:Acetato); as outras duas partes foram denominadas de Mix 1 (Hexano puro → 96:4) e Mix 2 (93:7 → Acetato puro), que contemplaram as demais frações presentes na CCD. Foi realizada uma nova CCD com as quatro partes para a comprovação de uma boa separação das amostras e para a sua comparação com os espectros de massas da amostra original para identificação de compostos.

Para avaliar a presença dos outros compostos na formulação de tocotrienol 70%, foi elaborada uma placa preparativa de sílica, em que cada parte separada via luz ultravioleta foi coletada em um frasco diferente; desta forma, foram observadas cinco regiões distintas cm a luz UV. Foram denominadas de F (tocotrienol de interesse), F+1 (uma faixa acima da F), F+2 (duas faixas acima da F), F-1 (uma abaixo da F), R (residual). A CCD realizada após a coleta das cinco partes descritas acima

Figura 3: CCD realizada após placa preparativa



está ao lado (Figura 3), confirmando uma boa separação do tocotrienol na fração F do restante dos componentes nas demais partes.

Também foi avaliada a amostra tocotrienol 70% por cromatografia gasosa acoplada a detectos de massas (GC-MS). A análise foi realizada para se ter o parâmetro de quais são os componentes que existem na porção residual que não fosse o próprio composto tocotrienol. Com o espectro em mãos (Figura 4), foi-se possível identificar a presença de três principais grupos. No primeiro grupo, no intervalo de 6-12 minutos, se observa a presença de monoterpenos de baixas massas molares, presentes nos 30% residuais da composição inicial. O segundo grupo, no intervalo 18 -20 minutos, se refere a compostos de cadeia linear e sesquiterpenos. Por fim, o terceiro e maior grupo na faixa dos 34 -38 minutos, referente aos isômeros delta, gama e beta do tocotrienol, mostrando a nítida presença dele na amostra.

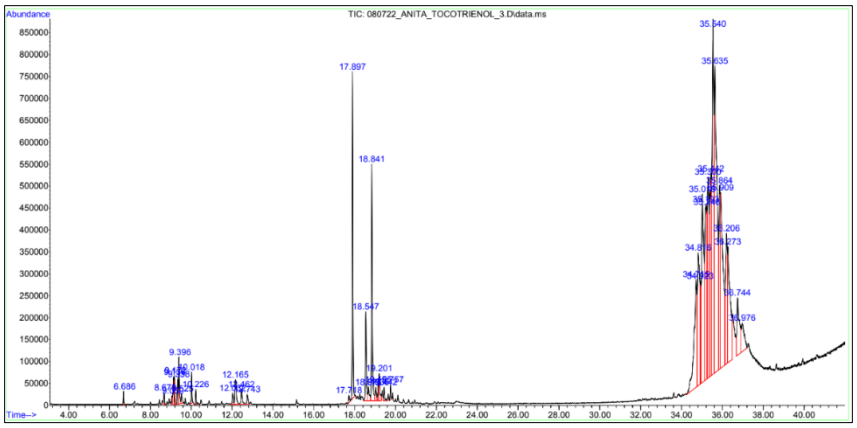


Figura 4: Espectro GC-MS do tocotrienol 70%

CONCLUSÕES:

O trabalho de qualificação de ingredientes de origem natural envolve estudos de segurança, eficácia e reprodutibilidade. Neste trabalho foi iniciado a identificação dos componentes da mistura para posterior definição dos marcadores e teores a serem padronizados para garantir a reprodutibilidade do ingrediente. Os estudos in vitro em células tumorais e não tumorais fornece dados preliminares dos efeitos de toxicidade da amostra.

BIBLIOGRAFIA:

[1] J. Nat. Prod. 2020, 83, 3, 770–803;Publication Date:March 12, 2020; https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285; Copyright © 2020 American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy.

[2] Rosanna Tarkany Basting , Pedro Manoel Barreto de Abreu , Ilza Maria de Oliveira Sousa , João Ernesto de Carvalho , Paulo Roberto Nogueira Carvalho & Mary Ann Foglio (2020): Bixaorellana L. by-products' fractions from an industrial process: antiproliferative activity on tumor cells and chemical profile, Natural Product Research, DOI: 10.1080/14786419.2020.1826482

[3] Costa, C.K., Silva, C.B., Lordello, A.L.L., Zanin, S.M.W., Dias, J.F.G., Miguel, M.D., Miguel, O.G., 2013. Identificação de δ tocotrienol e de ácidos graxos no óleo fixo de urucum (Bixa orellana Linné). Revista Brasileira de Plantas Medicinais 15, 508–512.. doi:10.1590/s1516-05722013000400006