



## Avaliação do efeito citotóxico/antitumoral do extrato de hortelã

### Evaluation of the cytotoxic/antitumor effect of mint extract

Ingrid Martins Bandiera<sup>1</sup>, Patrícia Aline Bressiani<sup>2</sup>, Lilian Tatiani Dusman Tonin<sup>3</sup>,  
Elisângela Düsman<sup>4</sup>

#### RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais causa a morte no mundo, sendo que os alimentos funcionais podem desempenhar um papel benéfico na redução do risco desta doença. As hortelãs são plantas herbáceas e ervas aromáticas perenes que são cultivadas por seus óleos essenciais usados tanto para fins medicinais quanto culinários. Devido à escassez de estudos com relação a atividade antitumoral da hortelã, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade/atividade antiproliferativa do extrato hidroetanólico de hortelã para células tumorais hepáticas humanas (HuH7.5), pelo teste do MTT. Os resultados demonstraram que as concentrações de 200, 300, 400 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em 24 horas, 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em 48 horas e, todas as concentrações em 72 horas apresentaram atividade antitumoral. Destaca-se a concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que atingiu valores de viabilidade celular de 53,47% (24 horas), 49,35% (48 horas) e 29,20% (72 horas). Sugere-se outros estudos, com outras linhagens celulares, a fim de avaliar o efeito citotóxico da hortelã para outros tipos de câncer.

**PALAVRAS-CHAVE:** Huh7.5; *Mentha L.*; Teste do MTT.

#### ABSTRACT

Cancer is one of the diseases that causes the most deaths worldwide, and functional foods can play a beneficial role in reducing the risk of this disease. Mint is a perennial herbaceous plant and aromatic herb cultivated for its essential oils used for both medicinal and culinary purposes. Due to the lack of studies regarding the anti-tumor activity of mint, the aim of this study was to evaluate the cytotoxic/antiproliferative activity of the hydroethanolic extract of mint on human liver tumor cells (HuH7.5) using the MTT assay. Statistical analysis showed that concentrations of 200, 300, 400, and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  at 24 hours, 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  at 48 hours, and all concentrations at 72 hours exhibited antitumor activity. The concentration of 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  is noteworthy, as it achieved cell viability values of 53.47% (24 hours), 49.35% (48 hours), and 29.20% (72 hours). Further studies with different cell lines are suggested to assess the cytotoxic effect of mint on other types of cancer.

**KEYWORDS:** Huh7.5; *Mentha L.*; MTT test.

#### INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022), o câncer é um termo que abrange mais de 100 doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância. Essas células, que se dividem rapidamente, tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de

<sup>1</sup> Voluntária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: ingridmartinsbandiera@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2756824615907686.

<sup>2</sup> Pós-graduanda em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: pbressiani@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 624429410414856.

<sup>3</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: liliandusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5182710800072951.

<sup>4</sup> Docente do Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: edusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 0834228211589445.



células do corpo. Sua prevenção tem tomado uma dimensão importante no campo da ciência, uma vez que recentemente foi apontada como a primeira causa de mortalidade no mundo (GARÓFOLO e AVESANI, 2004).

Como tratamento para o câncer se é utilizado a quimioterapia, que são distribuídos em todo o corpo por meio do transporte sanguíneo, destruindo as células doentes que formam o tumor e impedindo que se espalhem (INCA, 2020). Os alimentos funcionais, caracterizados por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas degenerativas, como câncer e diabetes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimentos, lançada pelo Japão na década de 80, que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004). As hortelãs são plantas herbáceas e ervas aromáticas perenes que são cultivadas por seus óleos essenciais usados tanto para fins medicinais quanto culinários. Essas plantas pertencem ao gênero *Mentha* L. (Lamiaceae) e nativas das regiões temperadas do Norte e ocorrem em todos os cinco continentes (GOBERT et al., 2002).

Por conta de seu aroma e sabor refrescante, o óleo da hortelã é utilizado em perfumes, cosméticos, confeitaria e indústrias farmacêuticas. O óleo conhecido como hortelã-pimenta é muito utilizado para dor de cabeça, dor no nervo, dor de dente, inflamação bucal, condições articulares, coceira, erupção alérgica, repelindo mosquito, reumatismo, dores, entre outras (KUMAR et al., 2015).

Assim, devido à escassez de estudos com relação a atividade antitumoral da hortelã, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade/atividade antiproliferativa do extrato hidroetanólico de hortelã para células tumorais hepáticas humanas.

## METODOLOGIA

### SOLUÇÃO TRATAMENTO

O extrato hidroetanólico de hortelã foi produzido e cedido pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lilian Tatiani Dusman Tonin da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Apucarana, que trabalha em parceria com o nosso grupo de pesquisa. A *Mentha piperita in natura* foi obtida na cidade de Apucarana - Paraná, Brasil. A hortelã foi seca em estufa (SOLAB SL-102) a 45 °C por aproximadamente 3 h e, em seguida, triturada.

Os extratos foram preparados em duplicata com 2,00 g de amostra em 40 mL de etanol:água 40:60 (v/v). As extrações foram realizadas em banho ultrassônico (Solid Steel SSBu-38L) por 30 min a 42°C. Filtrou-se os extratos em funil analítico, utilizando papel filtro qualitativo (80 g m<sup>-2</sup>) e completou-se os volumes até 40 mL com o solvente. Em seguida, os extratos foram armazenados sob refrigeração em frascos âmbar, para posterior análise.

### LINHAGEM CELULAR

A linhagem de células tumorais hepáticas humanas (Huh7.5) foi cultivada em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 10 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 15% de soro bovino fetal, e incubados em estufa a condição padrão de 37 °C com 95% de ar umidificado e 5% de CO<sub>2</sub>.



## TESTE DE CITOTOXICIDADE DO MTT

A realização do teste de citotoxicidade foi feita a partir do ensaio da atividade metabólica mitocondrial, também conhecido como teste de (MTT) [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il) -2,5-diphenil tetrazolium bromide], em conformidade com o protocolo de Mosmann (1983), contendo algumas alterações.

Para tal utilizou-se placas de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas  $1,0 \times 10^4$  células Huh7.5 por poço. Após 24 horas descartou-se o meio de cultivo e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio completo aos poços, da seguinte forma para cada conjunto: controle negativo (CO-) somente com o meio de cultura, controle positivo (CO+) com o agente citotóxico metil metanossulfanato (MMS 500  $\mu\text{M}$ ) e os tratamentos com as concentrações de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato.

As células estiveram incubadas por 24, 48 e 72 horas. Com o término do tempo de cada tratamento, substitui-se o meio de cultura por 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura não suplementado e complementado por MTT (0,167 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). A placa foi incubada novamente por mais 4 horas, em seguida, realizou-se o descarte da solução contendo MTT e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de DMSO aos poços, de forma a dissolver os cristais de formazan. Por fim, a leitura das absorbâncias foi efetuada em uma leitora de microplaca (Thermo Plate) a 492 nm. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão das absorbâncias e submetidos à análise de variância (one way ANOVA), seguida do teste de Dunnett, utilizando o software *Action Stat*. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de p menor que 0,05.

Os valores de viabilidade celular (VC) foram estimados conforme a Equação 1.

$$VC = \left( \frac{ABS_T}{ABS_{CO-}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

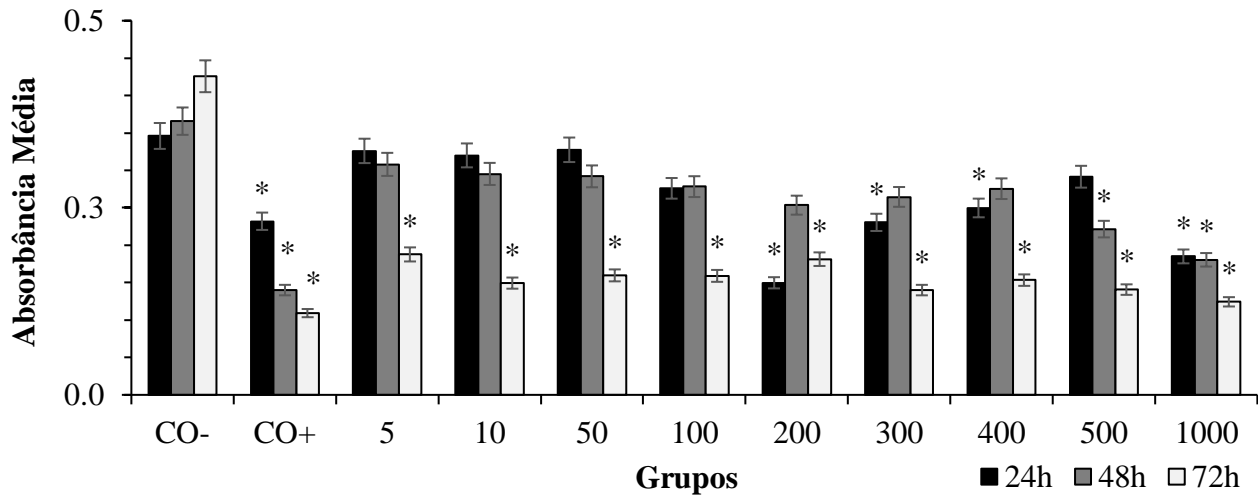
$ABS_T$  = Absorbância do tratamento;

$ABS_{CO-}$  = Absorbância do controle negativo.

## RESULTADOS E DISCUÇÕES

Na Figura 1 são apresentados os resultados das absorbâncias médias dos tratamentos das células tumorais com o extrato hidroetanólico da hortelã. A análise estatística mostra que as concentrações de 200, 300, 400 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , no menor tempo observado (24 horas), apresentaram-se citotóxicas, com absorbâncias médias estatisticamente menores que a do controle negativo. Também é possível observar citotoxicidade em algumas concentrações no tempo de avaliação de 48 horas (500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Assim como, a atividade antitumoral no tempo de avaliação de 72 horas em todas as concentrações.

**Figura 1.** Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais hepáticas humana tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do extrato hidroetanólico da hortelã.



CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo. \* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet,  $p < 0,05$ ).

Fonte: Autoria própria, 2023.

Os dados das viabilidades celulares (Tabela 1) mostram que nas concentrações de 5, 10, 50, 100, 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pode-se observar um efeito dependente do tempo, em que, quanto maior o tempo de avaliação menor a viabilidade celular, com destaque para a concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que atingiu valores de viabilidade celular de 53,47% (24 horas), 49,35% (48 horas) e 29,20% (72 horas).

**Tabela 1.** Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais hepáticas humanas, tratadas com as diferentes concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do extrato etanólico da hortelã, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.

Grupos	HuH7.5		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	67,05	38,28	25,66
5	94,22	84,21	44,08
10	92,49	80,72	35,08
50	94,65	79,84	37,50
100	79,77	76,08	37,35
200	43,28	69,31	42,59
300	66,62	72,32	32,88
400	72,18	75,32	36,01
500	84,25	60,56	33,04
1000	53,47	49,35	29,20

CO-: Controle negativo; CO+: Controle positivo.

Fonte: Autoria própria, 2023.



Segundo Mahendran et al. (2021) o óleo da hortelã (*Mentha spicata* L.) apresentou atividade antitumoral em linhagens celulares de câncer cólon humano e mama humano, sendo que a dose que resultou em 50% de mortalidade destas células (LD<sub>50</sub>) foi 975±156 µg mL<sup>-1</sup> e 279±52 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Esmaeili et al. (2023) também avaliou a atividade antitumoral da hortelã (*Mentha piperata* L.), sendo a mesma espécie avaliada no presente. Os valores também foram exibidos em LD<sub>50</sub> para câncer de próstata (237±46,6 µg mL<sup>-1</sup>), câncer de pulmão (441,8±38,7 µg mL<sup>-1</sup>) e câncer de mama (400,3 ± 27,9 µg mL<sup>-1</sup>).

Desta forma, pode-se perceber que para a linhagem hepática do presente estudo o efeito antitumoral foi mais eficiente pois, no tempo de 72 horas, desde concentrações de 5 µg mL<sup>-1</sup> já se observa menos de 50% de viabilidade celular. Este efeito pode ser devido à própria composição do extrato hidroetanólico, que permitiu a extração de compostos polares e apolares da hortelã. Assim como, o evidente efeito citotóxico do extrato dependente do tempo de exposição, ou seja, quanto maior o tempo, maior a toxicidade, desde as menores concentrações.

## CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo confirmam a atividade antiproliferativa do extrato hidroetanólico da hortelã, principalmente com evidente diminuição da viabilidade celular com o tempo de exposição. Sugere-se outros estudos, com outras linhagens celulares, a fim de avaliar o efeito citotóxico para outros tipos de câncer.

## Agradecimentos

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela Bolsa Produtividade concedida à Profa. Dra. Elisângela Düsman (CNPq#305029/2022-3).

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

ANJO, D.L.C. **Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular.** *Jornal Vasculiar Brasileiro*, v. 3, n. 2, p. 145- 154, 2004.

ESMAEILI, F.; FARHADPOUR, M.; ABBAS-MOHAMMADI, M.; ALILOU, M.; MORSHEDI, D.; EBRAHIMIE, E.; LOHRASEBI, T. **Appraisals on the anticancer properties of Mentha species using bioassays and docking studies.** *Industrial Crops and Products*, v. 203, p. 117128, 2023.

GARÓFOLO, A.; AVESANI C.M. **Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico.** *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, 2004.



GOBERT, V.; MEU, S.; COLSON, M.; TABERLET, P. **Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers.** *American Journal of Botany*, v. 89-12, p. 2017-23, 2002.

INSTITUIÇÃO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). **O que é câncer?** Rio de Janeiro: INCA; 2022.

INSTITUIÇÃO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). **Quais os efeitos colaterais da quimioterapia.** Rio de Janeiro: INCA, 2020.

KUMAR, B., KUMAR, U., YADAV, H.K. **Identification of EST-SSRs and molecular diversity analysis in *Mentha piperita*.** *The Crop Journal*, v.3, p.335-342, 2015.

MAHENDRAN, G.; VERMA, S.K.; RAHMAN, L.U. **The traditional uses, phytochemistry and pharmacology of spearmint (*Mentha spicata* L.): a review.** *Journal Of Ethnopharmacology*, v. 278, p. 114266, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Biblioteca Virtual Em Saúde Do Ministério Da Saúde*. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/dicas/220\\_alimentos\\_funcionais.html#:~:text=Os%20alimentos%20funcionais%20caracterizam%2Dse,c%C3%A2ncer%20e%20diabetes%2C%20dentre%20outras](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html#:~:text=Os%20alimentos%20funcionais%20caracterizam%2Dse,c%C3%A2ncer%20e%20diabetes%2C%20dentre%20outras). Acesso em 29 dez. 2022.

MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.