

# **Deteção da atividade anticancerígena de extratos usados na Medicina Tradicional Chinesa**

Dissertação de Mestrado

Ricardo Jorge Ferreira de Almeida

Mestrado em

**Ciências Biomédicas**



# **Deteção da atividade anticancerígena de extratos usados na Medicina Tradicional Chinesa**

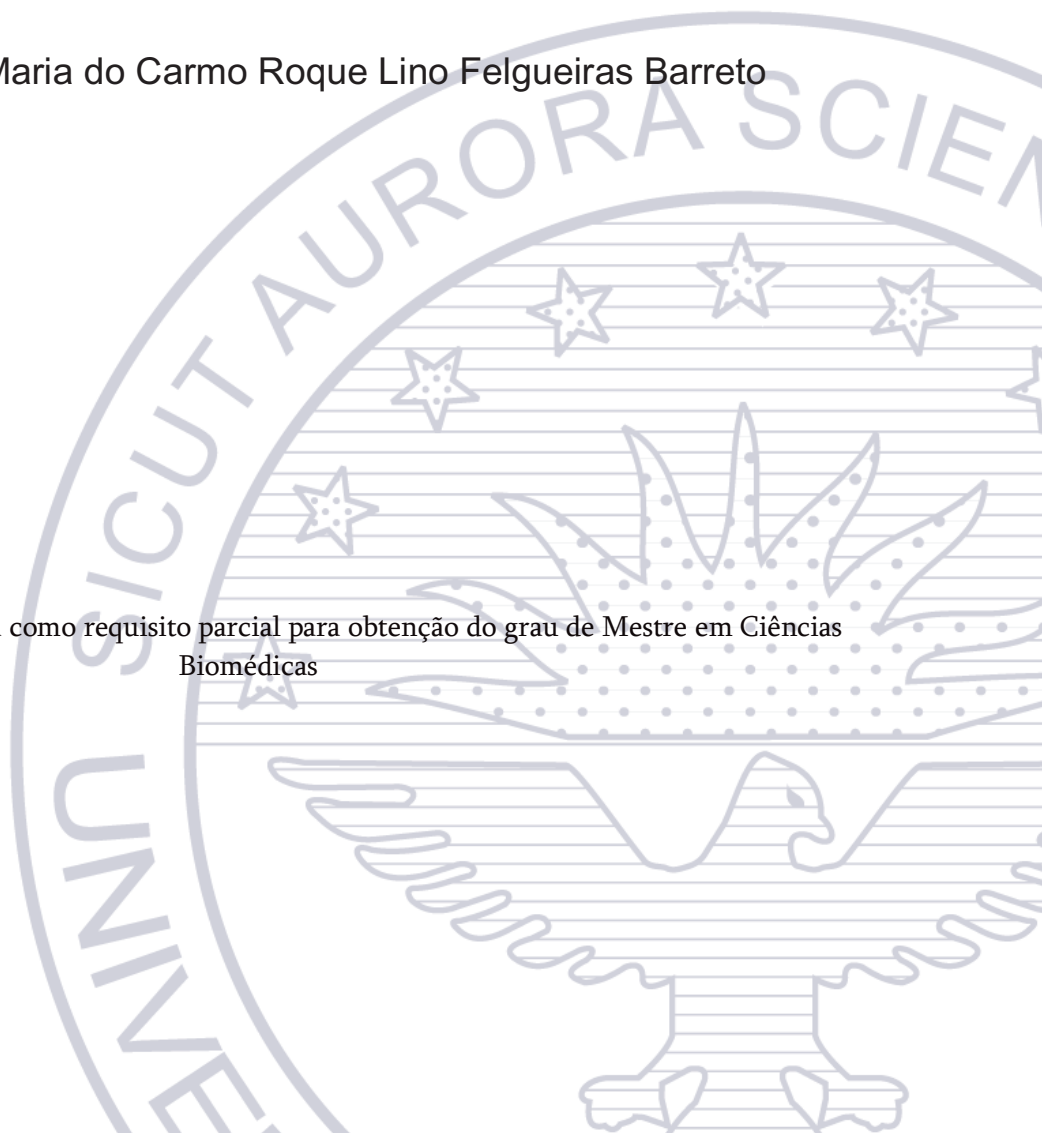
Tese de Mestrado

Ricardo Jorge Ferreira de Almeida

## **Orientador**

Professora Doutora Maria do Carmo Roque Lino Felgueiras Barreto

Tese de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de deixar uma mensagem de agradecimento a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação:

em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Maria do Carmo Roque Lino Felgueiras Barreto, orientadora desta dissertação, pelos imprescindíveis ensinamentos, pelo incansável acompanhamento, rigor científico, pela disponibilidade e paciência que demonstrou ao longo deste trabalho;

ao Professor Doutor José Silvino Rosa, pela prontidão, ensinamentos e apoio prestado;

a todos colegas de laboratório, o meu agradecimento pelo apoio demonstrado, em especial ao Mestre Gonçalo Rosa, pela disponibilidade e apoio demonstrado;

à Sra. Helena Figueiredo pelo apoio técnico em laboratório e pela disponibilidade demonstrada;

à Raquel, pelo o apoio, paciência e compreensão ao longo desta dissertação.

## RESUMO

Nas últimas décadas, as terapias direcionadas para o tratamento do cancro apontam para o desenvolvimento de uma medicina personalizada. Apesar dos avanços tecnológicos, a taxa de sobrevivência para alguns tipos de cancros avançados ou recorrentes ainda é insatisfatória, sendo nestes casos o objetivo de tratamento o prolongamento da sobrevida, com qualidade de vida. Desta forma, a procura de medicinas alternativas e complementares têm aumentado nos últimos tempos.

A Medicina Tradicional Chinesa (MTC) é uma das medicinas complementares mais utilizadas em todo mundo em pacientes com cancro. A função terapêutica da fitoterapia é mais abrangente, permitindo reforçar e aumentar a resistência endógena do corpo perante a doença e reduzir os efeitos secundários do tratamento por quimioterapia e radioterapia. No entanto, os mecanismos de atuação da fitoterapia usada na MTC permanecem pouco compreendidos e a sua ação terapêutica ainda não foi totalmente esclarecida.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar atividades biológicas indicativas de efeito antitumoral em extratos de plantas ou preparados usados como anticancerígenos na MTC: *Mentha haplocalyx* (Bo He), *Amomi fructus* (Sha Ren), *Triticum aestivum carpopsis* (Fu Xiao Mai) e *Fossilia ossis mastodi* (Long gu). As atividades testadas foram as antioxidantes, através do método de remoção dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> e pela redução do Cloreto de Ferro, as atividades anti-inflamatórias pela desnaturação da albumina e inibição da protease tripsina, e as atividades antitumoral *in vitro* contra células A549 (carcinoma humano de pulmão). Testou-se ainda a toxicidade dos extratos contra *Artemia salina*. Constatou-se que os extratos de *Mentha haplocalyx* e *Amomi fructus* obtiveram atividades muito significativas em todos os ensaios que foram testados, com valores próximos dos controlos. O extrato de *Mentha haplocalyx* apresentou uma atividade superior ao controlo na inibição da desnaturação da albumina e teve uma atividade citotóxica muito relevante contra células tumorais A549.

O extrato de *Triticum aestivum carpopsis* demonstrou a maior percentagem de inibição de células tumorais A549, com um valor de inibição de 94,9%, apresentando também boa atividade na proteção da desnaturação de albumina e demonstrou alguma atividade antioxidante.

O extrato de *Fossilia ossis mastodi* apresentou atividade anti-inflamatória relevante, próxima dos valores dos restantes extratos. Contudo, demonstrou uma atividade citotóxica baixa e não foi observada nenhuma atividade antioxidante.

Nenhum dos extratos provocou qualquer efeito letal sobre *Artemia salina* até concentração máxima testada, sugerindo que estes extratos não têm toxicidade significativa em organismos multicelulares.

Estes resultados confirmam o interesse da utilização de *Mentha haplocalyx* e *Amomi fructus* como coadjuvantes no tratamento do cancro, e são promissores para uma nova perspetiva de abordagem no tratamento desta patologia.

**Palavras chaves:** Atividade anticancerígena, MTC, *Mentha haplocalyx*, *Amomi fructus*, *Triticum aestivum carpopsis*, *Fossilia ossis mastodi*.

## ABSTRACT

In the last decades, targeted therapies for the treatment of cancer point out to the development of personalized medicine. Despite technological advances, the survival rate for some types of advanced or recurrent cancers is still unsatisfactory, the objective of treatment in these cases being to increased survival, with quality of life. In this way, the demand for alternative and complementary medicines has increased in recent times.

Traditional Chinese Medicine (TCM) is one of the most commonly used complementary medicines in cancer patients worldwide. The therapeutic function of phytotherapy is more comprehensive, allowing strengthening and increase endogenous resistance of the body to the disease and reduce the side effects of treatment by chemotherapy and radiotherapy. However, the mechanisms of action of herbal medicine used in TCM remain poorly understood and its therapeutic action has not yet been fully elucidated.

The objective of this study was to evaluate biological activities indicative of antitumor effect in extracts of plants or preparations used as anticancer agents in TCM: *Mentha haplocalyx* (Bo He), *Amomi fructus* (Sha Ren), *Triticum aestivum carpopsis* (Fu Xiao Mai) and *Fossilia ossis mastodi* (Long gu). The activities tested were antioxidants, through the removal of DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals and the reduction of Iron Chloride, anti-inflammatory activities by albumin denaturation and inhibition of protease trypsin, and *in vitro* antitumor activities against A549 cells (human lung carcinoma). The toxicity of extracts against *Artemia salina* was also tested. It was found that the extracts of *Mentha haplocalyx* and *Amomi fructus* obtained a highly significant activity in all the tests that were carry out, with values close to the controls. The *Mentha haplocalyx* extract showed a higher activity than the control in the inhibition of albumin denaturation and had a relevant cytotoxic activity against A549 tumor cells.

The extract of *Triticum aestivum carpopsis* demonstrated the highest percentage of inhibition of A549 tumor cells, with inhibition value of 94.9%, also showing good activity in the protection of albumin denaturation and some antioxidant activity.

The extract of *Fossilia ossis mastodi* presented relevant anti-inflammatory activity, close to the values of the remaining extracts. However, it demonstrated low cytotoxic activity and no antioxidant activity was observed.

None of the extracts caused any lethal effect on *Artemia salina* up to the maximum concentration tested, suggesting that these extracts do not have significant toxicity in multicellular organisms.

These results confirm the interest of using *Mentha haplocalyx* and *Amomi fructus* as adjuvants in the treatment of cancer and are promising for a new approach perspective in the treatment of this pathology.

**Keywords:** Anticancer activity, TCM, *Mentha haplocalyx*, *Amomi fructus*, *Triticum aestivum carpopsis*, *Fossilia ossis mastodi*.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**A549** – Células epiteliais do adenocarcinoma basal alveolar humano

**Abs** – Absorvância

**AbsA** – Absorvância da amostra

**AbsC** – Absorvância do controlo

**ABTS<sup>•+</sup>** – 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfonado)

**ANOVA** – Análise de variância

**AINE** – Anti-inflamatório não esteróide

**BSA** – Albumina de soro bovino

**CVA16** – Coxsackievirus A16

**DPPH<sup>•</sup>** – 2,2 difenil-1-picrilidrazila

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DW** – Danzhixiaoyao Wan

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DMF** – Dimetilformamida

**EC<sub>50</sub>** – Concentração efetiva que provoca 50% do efeito máximo

**FeCl<sub>3</sub>** – Cloreto de Ferro

**FWGE** – Gérmen de trigo fermentado bruto

**LC<sub>50</sub>** – Concentração letal que provoca a morte a 50% da amostra

**MALT** – Tecido linfoide das mucosas

**MTC** – Medicina Tradicional Chinesa

**MTT** – *Brometo* de 3-(4,5 dimetil) *tiazol-2-il-2,5-difenil tetrazólio*

**MeOH** – Metanol

**NF<sub>κ</sub>B** – Fator nuclear de transcrição kappa-B

**NK** – Natural Killer

**NO** – Oxido Nítrico

**ORAC** – Capacidade de absorvância do radical de oxigénio

**RMN** – Ressonância magnética nuclear

**RNS** – Espécies reativas de nitrogénio

**ROS** – Espécies reativas de oxigénio

**TCA** – Ácido tricloroacético

**TLR** – Recetores Toll-like

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
1. Conceitos básicos da MTC .....	4
2. Classificação da fitoterapia em MTC.....	11
3. A MTC e a Medicina Convencional .....	14
4. O desenvolvimento do cancro.....	15
5. Ação da fitoterapia da MTC nos mecanismos de evasão tumoral .....	19
6. Tratamento da sintomatologia associada ao cancro pela MTC .....	23
7. A Fitoterapia estudada .....	25
<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>II. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
1. Material em Estudo.....	37
2. Preparação dos extratos .....	37
3. Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	37
4. Determinação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> .....	41
5. Determinação da atividade citotóxica .....	44
6. Análise estatística .....	47
<b>III. RESULTADOS</b> .....	48
1. Rendimento .....	49
2. Efeito antioxidante dos extratos .....	49
3. Efeito Anti-inflamatório dos Extratos .....	52
4. Efeito de citotoxicidade dos extratos .....	54
<b>IV. DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>CONCLUSÃO</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Cinco elementos .....	6
<b>Figura 2</b> - Símbolo de <i>qi</i> .....	7
<b>Figura 3</b> - Produção de <i>qi</i> .....	8
<b>Figura 4</b> - <i>Mentha haplocalyx</i> .....	26
<b>Figura 5</b> - <i>Amomi fructus</i> .....	28
<b>Figura 6</b> - <i>Triticum aestivum</i> .....	30
<b>Figura 7</b> - <i>Fossilia ossis mastodi</i> .....	32
<b>Figura 8</b> - Fotografia da <i>Artemia salina</i> observada ao microscópio binocular (x25)	46
<b>Figura 9</b> - Percentagem das amostras e do padrão ácido acetilsalicílico na inibição da ação da protease tripsina .....	52

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Massa e rendimento dos extratos.....	49
<b>Tabela 2</b> - IC50 das amostras e dos controlos para os testes DPPH <sup>*</sup> , ABTS <sup>*+</sup> e redução do FeCl <sub>3</sub> .....	50
<b>Tabela 3</b> - Percentagem de inibição da desnaturação da albumina.....	54
<b>Tabela 4</b> – Citotoxicidade contra células A549 e mortalidade de <i>Artemia salina</i> .....	55

## INTRODUÇÃO

O cancro é uma doença multifatorial que envolve um crescimento celular anormal, com a capacidade de invasão ou de disseminação para outras partes do corpo (Efferth *et al.*, 2008). O cancro possui pelo menos seis características que lhe conferem capacidades biológicas para se desenvolver no organismo, sendo essas capacidades a sustentação de sinalização proliferativa, a evasão a supressores de crescimento, a resistência à morte celular, permitindo a imortalidade de replicação, a indução da angiogénese, a ativação da invasão e a metastização (Dai *et al.*, 2016). Apesar da luta constante que se faz hoje em dia, com os tratamentos mais comuns e mais eficazes contra o cancro, tais como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, o cancro continua a ser um assassino agressivo em todo o mundo (Dai *et al.*, 2016). O recurso às medicinas alternativas complementares aumentou nas últimas décadas (Barisone *et al.*, 2018). Embora carecendo de alguns estudos, o uso das medicinas alternativas complementares em pacientes oncológicos tem uma recorrência ainda maior devido à procura de terapias menos tóxicas e mais efetivas, do que os tratamentos convencionais (Barisone *et al.*, 2018).

Por todas estas razões, e apesar do melhoramento das técnicas cirúrgicas, da radioterapia, da quimioterapia, da terapia dirigida (targeted therapy) e da imunoterapia, existe um número crescente de pacientes que recorrem à MTC, cada vez mais popular no Ocidente, incluindo no que respeita aos tratamentos em pacientes com cancro (Li *et al.*, 2013; Nie *et al.*, 2016; Low & Ang, 2010). Existem estudos recentes que mostram que o tratamento com a MTC pode potenciar a resposta do tumor ao tratamento pela Medicina Convencional, também designada de medicina alopática (Sagar & Wong, 2007).

Para a MTC, a morte por cancro é uma consequência da desorganização e separação de *yin-yang*, havendo uma separação entre *jing* (essência vital) - *shen* (mental) e *sangue - qi* (energia) (Beinfeld & Korngold, 2003). Apesar de ser difícil estabelecer uma equivalência entre estes conceitos e os utilizados em medicina ocidental, há cada vez mais evidências da contribuição que a MTC pode ter no tratamento do cancro (Li *et al.*, 2013; Nie *et al.*, 2016).

A MTC ajuda no tratamento do cancro, como pode ajudar nos cuidados paliativos, reduzindo os efeitos colaterais do tratamento convencional e melhorando qualidade de vida dos pacientes (Li *et al.*, 2013).

Sendo o cancro uma doença multifatorial, o facto de a MTC recorrer a extratos e misturas significa que pode exercer uma função terapêutica mais abrangente, baseada em efeitos sobre diferentes alvos no sistema global do corpo humano, contribuindo para o equilíbrio no corpo do paciente, reforçando e aumentando a resistência endógena do corpo perante a doença (Nie *et al.*, 2016). Mas o recurso à fitoterapia da MTC em combinação com os fármacos utilizados pela medicina ocidental é ainda controverso, pois ainda não existem estudos que garantam a eficácia e a segurança da sua utilização (Sagar & Wong, 2008).

A MTC pode ser dividida em cinco grandes disciplinas de tratamento: fitoterapia chinesa, acupuntura, dietética chinesa e massagem *Tui Na*. A ginástica *Qi gong* é também incluída na MTC (Low & Ang, 2010). Neste trabalho só é abordado a área de fitoterapia chinesa.

Neste contexto, é necessário que haja uma melhoria do rigor e do conhecimento científico antes de serem recomendáveis para uso clínico.