



ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIGNINAS ALCALINAS EXTRAÍDAS DE FOLHAS DE *MORINDA CITRIFOLIA*

Carolina Ávila dos Anjos Santos¹, Lisandra da Silva Lima², Josué Filipe de Oliveira Moraes Miranda², Karla Crystina Costa dos Santos², Diego Santa Clara Marques², Iranildo José da Cruz Filho².

¹Departamento de Antibióticos – CB/UFPE, Recife, Brasil
(Carolinaavilaanjos@gmail.com)

²Departamento de Antibióticos – CB/UFPE, Recife, Brasil

Resumo: *Morinda citrifolia* é uma planta da família *Rubiaceae*, que possui um alto potencial biológico. Neste trabalho, foi investigada a atividade antitumoral *in vitro*. As ligninas isoladas das folhas demonstraram atividade antitumoral, sendo capazes de inibir o crescimento de diferentes células tumorais, sem apresentar grande citotoxicidade. Esses resultados indicam o potencial das ligninas alcalinas como agentes antitumorais e sua possível aplicação no desenvolvimento de produtos e farmacêuticos.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia*; ligninas alcalinas; antitumoral; produtos naturais.

INTRODUÇÃO

Com uma estimativa de 704 mil casos por ano no Brasil (INCA, 2022) O câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais, que podem invadir tecidos adjacentes. (World Health Organization, 2022). Tal conjunto de patologias representa um dos principais problemas de saúde global e a resistência aos quimioterápicos de referência, dificultam a terapêutica ligada a essas doenças (Sung et al. 2021).

Nesse contexto, o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais é extremamente necessário. A busca por moléculas com seletividade, baixa toxicidade (Galluzzi et al. 2018) e mecanismos inovadores de ação tem motivado o estudo de fontes naturais, como plantas medicinais e seus constituintes, que oferecem diversidade química e potencial terapêutico ainda pouco explorado (Atanasov et al. 2021).

Dessa forma, as ligninas se apresentam como macromoléculas complexas e formadas por unidades fenilpropanóides repedidas de maneira irregular (Huang et al., 2022). Presente em diversas plantas, a biossíntese das ligninas se dá pela via radicular a partir da reação de três álcoois, que geram as subunidades Guaiacil (G), Siringil (S) e p-hidroxibenzil (H), que podem variar de proporção a depender do organismo vegetal onde são sintetizada (Sugiarto et al., 2022).

Tal conhecimento se apresenta de extrema importância para o entendimento e possíveis aplicações das ligninas dentro da área de biociências, sua obtenção se dá em escala industrial através da produção de papel, gerando como subproduto a

matéria prima em questão, que dentro do contexto produtivo, é queimada para produção de energia. (Sethupathy et al. 2022; Zhang et al. 2022).

Porém, quando reaproveitadas, as ligninas alcalinas possuem diversas aplicações, principalmente na área de ciências da saúde, como agentes antioxidantes e antitumorais, conforme descrito por Araujo et al em 2022, imunomoduladores (Cruz Filho et al. 2019, Nascimento Santos et al. 2020), antiparasitários (Silva et al. 2021), entre outras aplicações. Essas potenciais aplicações estão diretamente relacionadas à estrutura química dessas macromoléculas, principalmente ao teor de compostos fenólicos (Kimura et al. 2022).

Nesse contexto, destaca-se a planta *Morinda citrifolia* popularmente conhecida como Noni, esta espécie é de grande utilização para fins medicinais (Ali et al. 2016). Apesar do vasto conhecimento sobre os extratos vegetais desse organismo vegetal, existem poucos trabalhos acerca das ligninas presentes nessa espécie, a partir dessa necessidade, foi elaborado pelo grupo de pesquisa e publicado em 2021 por Silva et al. A caracterização físico-química da lignina alcalina obtida a partir das folhas da *Morinda citrifolia*. Nesse sentido, o presente trabalho busca avaliar a atividade antitumoral das ligninas alcalinas, bem como sua citotoxicidade em células normais.

MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *Morinda citrifolia* foram coletadas no município de Cabo de Santo Agostinho, no estado de Pernambuco, Brasil (coordenadas: 8°29'86.07" S e 35°06'45.29" W). A autenticação botânica foi realizada no Herbário Geraldo Mariz, pertencente ao Departamento de Botânica do Centro



de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde um exemplar da planta foi depositado sob o número de registro 74.792. A coleta e o estudo do caule foram autorizados por meio de registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o número A2F0474.

A lignina alcalina avaliada neste estudo foi isolada das folhas de *Morinda citrifolia* no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica da UFPE, e teve seus métodos descritos previamente por Silva et al. (2021). Em resumo, as folhas foram secas, moídas e submetidas à extração aquosa na proporção 1:1 (g/L), em reator de 2 L, a 60 °C e 1200 rpm, por 1 hora. O sólido resultante foi tratado com ácido fosfórico (H_3PO_4 a 1%) em autoclave, a 121 °C, também durante 1 hora, na proporção 1:1 (g/L). Após filtração, o sólido foi submetido à deslignificação alcalina com solução de NaOH (hidróxido de sódio) a 1%, nas mesmas condições do tratamento ácido. O licor negro contendo a lignina foi então separado por filtração e acidificado com H_2SO_4 até atingir pH 2, permanecendo em repouso por 12 horas para a precipitação da lignina. Por fim, o material precipitado foi seco a 70 °C por 48 horas. Para a realização dos ensaios biológicos, a lignina foi diluída previamente em DMSO a 1%, na concentração final de 200 µg/mL.

Em relação a citotoxicidade *in vitro* os experimentos foram realizados conforme a metodologia descrita por Suleiman & Helal (2022). Para isso, foram utilizadas linhagens celulares normais, incluindo macrófagos (RAW 264.7), fibroblastos (V79) e células de rim de macaco (Vero), bem como diferentes linhagens tumorais humanas: MCF-7 e T-47D (câncer de mama), Jurkat (leucemia/linfoma), DU145 (câncer de próstata) e HepG2 (hepatocarcinoma).

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), em densidade de 1×10^6 células por poço. Após a estabilização, foram tratadas com diferentes concentrações de lignina (de 100 a 1,56 µg/mL), previamente dissolvida em DMSO a 1%. A incubação ocorreu por 72 horas em estufa com atmosfera controlada de CO_2 a 5%. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT, que mensura a capacidade metabólica mitocondrial das células viáveis. Após o período de incubação, os cristais de formazan formados foram solubilizados em DMSO e a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm. A partir desses dados, foi determinada a concentração inibitória de 50% (IC_{50}), utilizando ajuste não linear da curva dose-resposta.

Como padrão de comparação, foram utilizados fármacos antineoplásicos clássicos, como doxorubicina, amsacrina e asulacrina, testados sob as mesmas condições experimentais da lignina. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, com três repetições independentes para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Para avaliação da toxicidade sobre eritrócitos, foi realizado um ensaio hemolítico *in vitro*, conforme descrito por Araújo et al. (2022). O Sangue de camundongos foi coletado, e os eritrócitos foram isolados e diluídos em tampão salino fosfatado (PBS). As amostras foram então incubadas com diferentes concentrações de lignina (de 100 a 3,12 µg/mL, dissolvidas em DMSO 1%) por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, a liberação de hemoglobina, indicativa de hemólise, foi quantificada por espectrofotometria. Como controle negativo (0% de hemólise), foi utilizada apenas solução salina; o controle positivo (100% de hemólise) foi feito com Triton X-100. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata, permitindo a avaliação estatística da segurança hemática da lignina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se a citotoxicidade da lignina extraída das folhas de *Morinda citrifolia* frente a diferentes linhagens tumorais humanas, além de sua possível toxicidade em células normais e eritrócitos. A Tabela 1 apresenta os resultados de IC_{50} (concentração inibitória de 50%) obtidos apenas para as células tumorais, uma vez que nas concentrações avaliadas (1,56 a 100 µg/mL) não foi possível determinar a IC_{50} para células normais (RAW 264.7, V79 e Vero), indicando baixa ou nenhuma citotoxicidade para essas linhagens. Além disso, os ensaios hemolíticos demonstraram que a lignina testada não induziu hemólise significativa, com taxa próxima de 5%, o que sugere um bom perfil de segurança.

Tabela 1. Ensaios de citotoxicidade contra linhagens celulares tumorais.

CT	L	DX	AM	AS
MCF-7	27.0 ± 0.1	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
T-47D	32.7 ± 0.4	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.4	1.5 ± 0.4
Jurkat	19.4 ± 0.2	0.7 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
DU145	52.3 ± 0.9	0.76 ± 0.0	0.80 ± 0.01	1.37 ± 0.1
HepG2	75.6 ± 0.1	1.54 ± 0.1	0.66 ± 0.0	1.4 ± 0.1



Legenda: CT: Células tumorais; L: Lignina; DX: Doxorubicina; AM: Amsacrina; AS: Asulacrina.
Resultados expressos em CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

Os valores de IC_{50} obtidos para as células tumorais indicaram que a lignina foi capaz de inibir o crescimento celular, sendo a linhagem Jurkat (leucemia/linfoma) a mais sensível, seguida por MCF-7 (câncer de mama), T-47D (câncer de mama), DU145 (câncer de próstata) e, por fim, HepG2 (hepatocarcinoma). É importante destacar que valores menores de IC_{50} indicam maior atividade citotóxica.

No entanto, ao comparar esses dados com os padrões de fármacos antineoplásicos utilizados, a lignina apresentou atividade inferior, com valores de IC_{50} mais elevados, o que indica menor potência citotóxica frente às substâncias de referência. Por não ter sido possível determinar a IC_{50} em células normais, não foi calculado o índice de seletividade (IS). Ainda assim, os dados sugerem que a lignina em estudo apresenta citotoxicidade seletiva para células tumorais, sem efeitos adversos relevantes em células não tumorais.

Esses achados estão em consonância com os resultados obtidos por Araujo et al. (2022), que avaliaram ligninas alcalinas isoladas dos ramos e folhas de *Buchenavia viridiflora*, e obtiveram valores de IC_{50} para as mesmas linhagens celulares tumorais. Os resultados reportados foram: Jurkat (21,37; 25,76 $\mu\text{g/mL}$), MCF-7 (12,63; 24,88 $\mu\text{g/mL}$), T-47D (25,46; 47,74 $\mu\text{g/mL}$), DU145 (37,56; 41,65 $\mu\text{g/mL}$) e HepG2 (>100 $\mu\text{g/mL}$). Da mesma forma, Barapatre et al. (2016), ao estudarem quatro frações de lignina extraídas de *Acacia nilotica*, observaram atividade citotóxica mais pronunciada para a linhagem MCF-7 (IC_{50} entre 2 e 15 $\mu\text{g/mL}$), sem apresentar toxicidade significativa para células hepáticas humanas normais (HHStCs), cujo IC_{50} foi $\geq 100 \mu\text{g/mL}$.

Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que a lignina de *Morinda citrifolia* possui potencial antitumoral *in vitro* além de baixa atividade hemolítica.

CONCLUSÃO

Com base nos estudos realizados, é possível concluir que a lignina extraída das folhas de *Morinda citrifolia* apresenta atividade antitumoral promissora *in vitro* além de uma baixa atividade hemolítica. Esses resultados indicam que essa macromolécula possui potencial para ser utilizada como matéria-prima no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, porém são necessários mais estudos.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT-UFPE), a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e

Tecnologia de Pernambuco) e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), bem como a Universidade Federal de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

Ali, Mohammad, Mruthunjaya Kenganora, and Santhepete Nanjundiah Manjula. "Health benefits of *Morinda citrifolia* (Noni): A review." *Pharmacognosy Journal* 8.4 (2016).

ARAUJO DMF ET AL. 2022. Biological activities and physicochemical characterization of alkaline lignins obtained from branches and leaves of *Buchenavia viridiflora* with potential pharmaceutical and biomedical applications, *Int J Biol Macromol* 219: 224-245. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.225>.

Atanasov AG, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*. 2021;39:107462.

BARAPATRE A, MEENA AS, MEKALA S, DAS A & JHA H. 2016. In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica*. *Int J Biol Macromol* 86: 443-453. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.109>

CRUZ FILHO IJ ET AL. 2019. Lignins isolated from Prickly pear cladodes of the species *Opuntia ficus-indica* (Linnaeus) Miller and *Opuntia cochenillifera* (Linnaeus) Miller induces mice splenocytes activation, proliferation and cytokines production. *Int J Biol Macromol* 123: 1331-1339. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.120>

Galluzzi L, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*. 2018;25(3):486–541.

HUANG C, PENG Z, LI J, LI X, JIANG X & DONG Y. 2022. Unlocking the role of lignin for preparing the lignin-based wood adhesive: A review. *Ind Crops Prod* 187: 115388. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115388>.

INCA. INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>>.

KIMURA C, OH SW, FUJITA T & WATANABE T. 2022. Adsorptive Inhibition of Enveloped Viruses and Nonenveloped Cardioviruses by Antiviral Lignin Produced from Sugarcane Bagasse via Microwave Glycerolysis. *Biomacromolecules* 23: 789-797. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01209>.



NASCIMENTO SANTOS DKD ET AL. 2020. Immunostimulatory and antioxidant activities of a lignin isolated from Conocarpus erectus leaves. Int J Biol Macromol 150: 169- 177. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.052>

SETHUPATHY S ET AL. 2022. Lignin valorization: status, challenges and opportunities. Bioresour Technol 347: 126696. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126696>.

SILVA PR ET AL. 2021. Lignin from Morinda citrifolia leaves: Physical and chemical characterization, in vitro evaluation of antioxidant, cytotoxic, antiparasitic and ultrastructural activities. Int J Biol Macromol 193: 1799- 1812. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.013>.

SUGIARTO S, LEOW Y, TAN CL, WANG G & KAI D. 2022. How far is Lignin from being a biomedical material? Bioact Mater 8: 71-94. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.023>.

SULEIMAN WB & HELAL EEH. 2022. Chemical constituents and potential pleiotropic activities of Foeniculum vulgare (Fennel) ethanolic extract; in vitro approach. Egypt J Chem 65(7): 617-626. <https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.107991.4938>.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021;71(3):209-249.

World Health Organization. Cancer. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

ZHANG W ET AL. 2022. Lignin derived carbon materials: current status and future trends. Carbon Research 1: 1-39. <https://doi.org/10.1007/s44246-022-00009-1>.