



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

MARIANA TOLEDO MARTINS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE
EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE
Myrciaria glazioviana FRENTE A LINHAGEM DE
CÂNCER CERVICAL (HeLa).**

Tese de Doutorado submetida a Universidade Federal Fluminense visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia

**Orientadores: Prof.^a Dr.^a Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal
Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Co orientador: Prof. Dr. Vinicius D'Avila Bitencourt Pascoal**



Nova Friburgo
2023

MARIANA TOLEDO MARTINS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS,
FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Myrciaria glazioviana*
FRENTE A LINHAGEM DE CÂNCER CERVICAL (HeLa).**

Trabalho desenvolvido no Laboratório Multiusuário de Cultura de Células e Tecidos Animais - LMCT do Departamento de Ciências Básicas do Instituto de Saúde de Nova Friburgo, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense. Apoio Financeiro: CAPES

Tese de Doutorado submetida a Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências e Biotecnologia

**Orientador(es): Prof^a Dr^a Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal
Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Prof. Dr. Vinicius D'Avila Bitencourt Pascoal**

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

P436a Pereira, Mariana Toledo Martins
Avaliação do Potencial Antiproliferativo de Extratos,
Frações e Compostos Isolados de Myrciaria glazioviana Frente
a Linhagem de Câncer Cervical (HeLa). / Mariana Toledo
Martins Pereira. - 2023.
93 f.: il.

Orientador: Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal.
Coorientador: Vinicius D'Avila Bitencourt Pascoal.
Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto
de Biologia, Niterói, 2023.

1. Produtos Naturais. 2. Câncer Cervical. 3. Myrciaria
glazioviana. 4. HeLa. 5. Produção intelectual. I. Pascoal,
Aislan Cristina Rheder Fagundes, orientadora. II. Pascoal,
Vinicius D'Avila Bitencourt, coorientador. III. Universidade
Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

MARIANA TOLEDO MARTINS PEREIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Myrciaria glazioviana* FRENTE A LINHAGEM DE CÂNCER CERVICAL (HeLa).

Tese de Doutorado submetida a
Universidade Federal Fluminense
como requisito parcial visando à
obtenção do grau de Doutor em
Ciências e Biotecnologia

Banca Examinadora:

Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado – Departamento de Biologia– Universidade Federal Fluminense - Orientador/Presidente

Dr^a Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal – Departamento de Ciências Básicas – Instituto de Saúde de Nova Friburgo (ISNF – UFF) – Orientadora

Prof. Dr. Vinicius D’Avila Bitencourt Pascoal – Departamento de Ciências Básicas – Instituto de Saúde de Nova Friburgo (ISNF – UFF) – Coorientador

Dr^a Patricia Sartorelli – Departamento de Química – Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema

Dr^a Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Campinas

Dr. Marcio Adriano Andreo – Departamento de Ciências Farmacêuticas– Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema

Dr^a Caroline de Souza Barros– Departamento de Imunobiologia – Universidade Federal Fluminense

Dr. Caio Pinho Fernandes – Departamento de Tecnologia Farmacêutica – Universidade Federal Fluminense

Dr^a Alessandra Freitas Serain – Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional – Instituto Nacional do Câncer (Suplente)

Dr. Leandro Rocha Machado – Departamento de Tecnologia Farmacêutica – Universidade Federal Fluminense (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por estar sempre iluminando e guiando meus caminhos.

Agradeço aos meus orientadores por terem me dado a oportunidade de estar realizando este trabalho, especialmente a Prof. Dr^a Aislan por acreditar em mim desde o trabalho de conclusão de curso da graduação. Obrigada por me apresentar o mundo da pesquisa com produtos naturais, serei eternamente grata por tudo o que me ensinou nesses (quase) 10 anos de convivência.

Agradeço a toda a minha família, em especial minha mãe Jane, por sempre me incentivar e me fazer acreditar que sou capaz.

Agradeço a todos os colegas dos laboratórios (LMPB e LMCT) e do grupo de pesquisa (GPPNMB), a caminhada fica mais leve quando caminhamos com amigos ao lado. Gostaria de agradecer especialmente ao Thiago, meu companheiro de vida e amigo de laboratório. Obrigada por cada palavra amiga, por toda ajuda quando precisei. Obrigada por dividir a bancada e a vida comigo.

Agradeço aos Professores Dr^a Raquel Castiglione, Dr. Bruno Robbs e Dr. Lucas Abreu por terem contribuído de maneira tão significativa para a realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Lucas gostaria de fazer um agradecimento especial por ter me recebido em seu laboratório e por ter tido paciência em me ensinar técnicas até então inéditas pra mim.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia da UFF e a CAPES pelo apoio.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XI
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	7
1.1 O CÂNCER, SEUS DESAFIOS NA MEDICINA E OS PRODUTOS NATURAIS.....	7
1.2 O CÂNCER CERVICAL.....	10
1.3 A IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS NA FARMACOLOGIA	13
1.4 FAMÍLIA <i>Myrtaceae</i> E O GÊNERO <i>Myrciaria</i>	15
1.5 <i>Myrciaria glazioviana</i>	16
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS - CAPÍTULO 1	21
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO 2	22
3. CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO BRUTO DE <i>M. glazioviana</i> E DE SUAS FRAÇÕES.....	23
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	23
3.1.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>M. glazioviana</i>	24
3.1.3 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DAS SUBSTÂNCIAS POR LC-MS.....	26
3.1.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>M. glazioviana</i>	27
3.1.4.1 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT – CÉLULAS HELA E NIH/3T3	27
3.1.4.2 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)	28
3.1.4.3 EXPRESSÃO DA ATIVAÇÃO DAS CASPASES EFETORAS 3/7, PERMEABILIDADE CELULAR E MORFOLOGIA DE MORTE CELULAR.....	29
3.1.4.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (Wound Healing Assay)	30
3.1.4.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS HeLa	30
3.2 RESULTADOS.....	32
3.2.1 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT EM CÉLULAS HeLa.....	32
3.2.2 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT EM CÉLULAS NIH/3T3.....	36
3.2.3 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....	37
3.2.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (WOUND HEALING ASSAY).....	38

3.2.5 EXPRESSÃO DA ATIVAÇÃO DAS CASPASES EFETORAS 3/7, PERMEABILIDADE CELULAR E MORFOLOGIA DE MORTE CELULAR	39
3.2.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS HeLa.....	40
3.2.7 DO PERFIL QUIMICO DAS SUBSTÂNCIAS POR LC-MS.....	42
3.3 DISCUSSÃO	46
4. CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO EXTRATO DICLOROMETANO DE <i>M. glazioviana</i>.....	51
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS FOLHAS DE <i>M. glazioviana</i>	51
4.1.2 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS DE <i>M. glazioviana</i>	52
4.1.3 ANÁLISE DO PERFIL QUIMICO DO EXTRATO DICLOROMETANO POR LC- MS IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	53
4.1.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DOS COMPOSTOS ISOLADOS E DE SEU EXTRATO DE ORIGEM	54
4.1.4.1 ENSAIO DA ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT COM CÉLULAS HeLa E CÉLULAS NIH/3T3.....	54
4.1.4.2 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)	54
4.1.4.3 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS HeLa.....	55
4.1.5 PREDIÇÃO <i>in silico</i> DE ALVOS MOLECULARES (<i>TARGET FISHING</i>)	55
4.2 RESULTADOS.....	55
4.2.1 ANÁLISE DO PERFIL QUIMICO DO EXTRATO DICLOROMETANO POR LC- MS, ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	55
4.2.2 ENSAIO DA ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT EM CÉLULAS HeLa.....	62
4.2.3 ENSAIO A ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT EM CÉLULAS NIH/3T3.....	64
4.2.4 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE	67
4.2.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS HeLa.....	68
4.2.6 PREDIÇÃO <i>in silico</i> DE ALVOS MOLECULARES (<i>TARGET FISHING</i>)	69
4.3 DISCUSSÃO	71
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
5.1 CONCLUSÃO	76
5.2 PERSPECTIVAS.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
8. ANEXO.....	84
8.1 IMAGENS MICROSCÓPICAS DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
CA	Anidrase Carbônica
CA I	Anidrase Carbônica Isoforma 1
CA VII	Anidrase Carbônica Isoforma 7
CA IX	Anidrase Carbônica Isoforma 9
CA XII	Anidrase Carbônica Isoforma 12
CA XIII	Anidrase Carbônica Isoforma 13
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDK6	Quinase-6 Dependente de Ciclina
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Tirosina Quinase
HPV	Papilomavírus humano
IC₅₀	Concentração Necessária para Inibir 50% das Células
IS	Índice de Seletividade
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa
MDR	Resistência a Multidrogas
MGA	Fração acetato de etila das folhas de <i>Myrciaria glazioviana</i>
MGD	Extrato diclorometânico das folhas de <i>Myrciaria glazioviana</i>
MGD2	Extrato diclorometânico das folhas de <i>Myrciaria glazioviana</i> – 2
MGEFr	Extrato etanólico dos frutos de <i>Myrciaria glazioviana</i>

MGH	Fração hidroalcoólica das folhas de <i>Myrciaria glazioviana</i>
MGHex	Fração hexânica das folhas de <i>Myrciaria glazioviana</i>
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Quimioterápicos derivados diretamente de produtos naturais	9
Figura 2	Quimioterápicos semi-sintéticos baseados em estruturas naturais	10
Figura 3	Imagens de <i>M. glazioviana</i> (folhas, frutos e sementes)	16
Figura 4	Distribuição geográfica da <i>M. glazioviana</i>	17
Figura 5	Compostos descritos e/ou isolados em <i>M. glazioviana</i> em estudos publicados previamente na literatura	20
Figura 6	Exsicata da <i>M. glazioviana</i>	24
Figura 7	Esquema da metodologia da obtenção dos extratos das folhas e frutos de <i>M. glazioviana</i>	25
Figura 8	Esquema da metodologia da partição líquido-líquido do extrato MGD	26
Figura 9	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células HeLa das amostras MGEFr e MGD	33
Figura 10	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células HeLa das amostras MGHex, MGH, MGA	34
Figura 11	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células HeLa das amostras Cloridrato de Doxorrubicina e DMSO	35
Figura 12	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células NIH/3T3 das amostras MGD, MGA e Cloridrato de Doxorrubicina	37
Figura 13	Análise estatística da migração de células HeLa em porcentagem	39
Figura 14	Expressão da ativação das caspases 3/7: MGA e MGD induzem a morte celular por apoptose	40
Figura 15	Análise do ciclo celular das células HeLa após o tratamento com MGD e MGA	42
Figura 16	Cromatogramas DAD das amostras MGD e MGA	43
Figura 17	Compostos anotados por LC-MS para MGD e MGA	45
Figura 18	Sobreposição dos cromatogramas DAD de MGD2 e MGD	56

Figura 19	Espectro de RMN de ^1H do Composto 1 em DMSO- d_6	57
Figura 20	Espectro de RMN de ^{13}C do Composto 1 em DMSO- d_6	58
Figura 21	Espectro de RMN de ^1H do Composto 2 em DMSO- d_6	59
Figura 22	Espectro de RMN de ^1H dos Compostos 1 e 2 e do ácido 3,4,4',5,5' – pentametil coruleoelágico em DMSO- d_6	60
Figura 23	Espectro de RMN de ^{13}C do Composto 2 em DMSO- d_6	61
Figura 24	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células HeLa da amostra MGD2	62
Figura 25	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células HeLa das amostras Composto 1 e Composto 2	63
Figura 26	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células HeLa das amostras Cloridrato de Doxorrubicina e DMSO	64
Figura 27	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células NIH/3T3 da amostra MGD2	65
Figura 28	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células NIH/3T3 das amostras Composto 1 e Composto 2	66
Figura 29	Avaliação da viabilidade celular por MTT em células NIH/3T3 das amostras Cloridrato de Doxorrubicina e DMSO	67
Figura 30	Análise do ciclo celular das células HeLa após o tratamento com MGD2, Composto 1 e Composto 2	69
Tabela 1	Valores de Índice de Seletividade das amostras MGD, MGA e Cloridrato de Doxorrubicina	37
Tabela 2	Proporção de células HeLa em SubG0, G1, S e G2/M após tratamento com MGD, MGA e Cloridrato de Doxorrubicina	41
Tabela 3	Caracterização dos compostos identificados por LC-MS em MGD e MGA	44
Tabela 4	Solventes utilizados e frações obtidas por CLV	52
Tabela 5	Valores de Índice de Seletividade das amostras MGD2, Composto 1, Composto 2 e Cloridrato de Doxorrubicina	67

Tabela 6	Proporção de células HeLa em SubG0, G1, S e G2/M após tratamento com MGD2, Composto 1 e Composto 2	68
Tabela 7	Predição <i>in silico</i> de alvos moleculares para o Composto 1 isolado de MGD2	70
Tabela 8	Predição <i>in silico</i> de alvos moleculares para o Composto 2 isolado de MGD2	70
Anexo 1	Imagens microscópicas do ensaio de migração celular	84

RESUMO

O câncer cervical, causado pela infecção persistente por tipos de HPV de alto risco oncogênico, tem uma incidência de 604 mil novos casos e 341 mil mortes por ano. A alta mortalidade e a resistência à multidrogas presentes nas células do câncer reforçam a necessidade da obtenção de novos tratamentos seguros e eficazes para essa patologia. A *Myrciaria glazioviana* é uma espécie brasileira da família *Myrtaceae*, com algumas atividades biológicas já definidas como antiinflamatória, antimicrobiana e antioxidante. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* dos extratos, frações e compostos isolados de *M. glazioviana* frente à linhagem de câncer cervical (HeLa). O extrato diclorometano das folhas de *M. glazioviana* (MGD) e sua fração acetato de etila (MGA), mostraram uma atividade antiproliferativa seletiva para as células HeLa, com valores de IC₅₀, obtidos através do ensaio de MTT, de 24,31 e 12,62 µg/mL, respectivamente. Tais amostras foram capazes de inibir a migração das células HeLa através do ensaio de migração celular. Também foi possível notar que ambas as amostras são capazes de ativar as caspases 3 e 7, indicando que atuam induzindo a apoptose das células tumorais. O perfil fitoquímico das amostras, foi estabelecido por LC-MS. Foram identificados 10 compostos dentre eles o ácido quínico, ácido elágico e quercetrina, os quais parecem ter relação direta com as atividades observadas. Através das técnicas de fitoquímica clássica foram isolados dois compostos a partir do extrato MGD2, identificados como ácido 3,3',4,4',5'-penta-metil coruleoelágico e ácido 3,3',4',5,5'-penta-metil coruleoelágico, os quais possuem atividade antiproliferativa seletiva para células HeLa com IC₅₀ de 3,77 e 2,89 µg/mL, respectivamente. Análises por citometria de fluxo indicaram que os compostos isolados são capazes de parar o ciclo celular das células HeLa na fase G2/M. Já as análises de *target fishing* indicaram que ambos os compostos possuem a enzima anidrase carbônica como alvo molecular. Essa enzima é fundamental para o processo de carcinogênese ao regular o pH do microambiente tumoral. Logo, a possível inibição desta enzima pode justificar os resultados obtidos no presente trabalho.

Palavras-chave: *Myrciaria glazioviana*, Câncer Cervical, Produtos Naturais, HPV, Compostos Fenólicos

ABSTRACT

Cervical cancer, caused by persistent infection with HPV types with high oncogenic risk, has an incidence of 604 thousand new cases and 341 thousand deaths per year. The high mortality and multidrug resistance present in cancer cells reinforce the need to obtain new safe and effective treatments for this pathology. *Myrciaria glazioviana* is a Brazilian species from the *Myrtaceae* family, with some biological activities already defined as anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant. The objective of this research was to evaluate the in vitro antiproliferative potential of extracts, fractions and compounds isolated from *M. glazioviana* against the cervical cancer lineage (HeLa). The dichloromethane extract of *M. glazioviana* leaves (MGD) and its ethyl acetate fraction (MGA) showed selective antiproliferative activity for HeLa cells, with IC₅₀ values, obtained through the MTT assay, of 24.31 and 12.62 µg/mL, respectively. Such samples were able to inhibit the migration of HeLa cells through the cell migration assay. It was also possible to note that both samples are capable of activating caspases 3 and 7, indicating that they act by inducing apoptosis of tumor cells. The phytochemical profile of the samples was established by LC-MS. Ten compounds were identified, including quinic acid, ellagic acid and quercetin, which appear to have a direct relationship with the observed activities. Using classical phytochemistry techniques, two compounds were isolated from the MGD2 extract: 3,3',4,4',5'-penta-methyl coruleoellagic acid and 3,3',4',5,5'-penta -methyl coruleoellagic, which have selective antiproliferative activity for HeLa cells with IC₅₀ of 3.77 and 2.89 µg/mL, respectively. Flow cytometry analysis indicated that the isolated compounds are capable of arresting the cell cycle of HeLa cells in the G2/M phase. Target fishing analyzes indicated that both compounds have the carbonic anhydrase enzyme as a molecular target. This enzyme is fundamental to the carcinogenesis process by regulating the pH of the tumor microenvironment. Therefore, the possible inhibition of this enzyme may justify the results obtained in the present study.

Keywords: *Myrciaria glazioviana*, Cervical Cancer, Natural Products, HPV, Phenolic Compounds

1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER, SEUS DESAFIOS NA MEDICINA E OS PRODUTOS NATURAIS

O câncer corresponde a um conjunto de mais de 100 doenças que possuem uma característica em comum: o crescimento desordenado de células que acabam invadindo tecidos e órgãos. Essas células dividem-se rapidamente e tendem a ser agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem sofrer metástases e se espalhar para outras regiões do corpo. Os tipos de câncer são determinados através do tipo de célula envolvido, bem como a velocidade da multiplicação celular e a capacidade de metástase (INCA, 2023).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por cerca de 9,9 milhões de mortes em 2020. Destas mortes, cerca de 7 milhões, ocorrem em países de baixa e média renda, locais onde o diagnóstico e tratamento são muitas vezes inacessíveis. A maioria dos cânceres está associada à riscos comportamentais e alimentares, como a obesidade e sedentarismo, baixo consumo de alimentos saudáveis, tabagismo, consumo de álcool e a exposição à agentes infecciosos, como por exemplo o HPV, e à carcinógenos ambientais, como os raios UV. Os tipos mais comuns de câncer são: câncer de pele não-melanoma, próstata, pulmão, colorretal, estômago, fígado e mama, sendo os últimos cinco, as causas mais comuns de morte por câncer (ROBBINS e COTRAN, 2016; WHO, 2023).

As células cancerosas são, em sua grande maioria, resistentes aos quimioterápicos existentes, fato que contribui para a evolução ao óbito em cerca de 80 a 90% dos casos de câncer em que há essa resistência (YUAN *et al.*, 2017). A resistência a multidrogas das células cancerosas, está relacionada a proteínas

específicas, que contribuem para a redução do nível de drogas antineoplásicas nas células, afetando a eficácia do tratamento. Este é o caso da Glicoproteína P, uma proteína de superfície presente na membrana citoplasmática, que se liga à quimioterápicos, como a doxorrubicina por exemplo, desencadeando a hidrólise de ATP e a mudança de conformação da proteína, o que resulta no efluxo da droga (ILLMER *et al.*, 2004). Outra característica das células cancerosas resistentes é a capacidade de desenvolver mecanismos que as protegem contra a citotoxicidade de fármacos, dos radicais livres e da radiação, ou seja, tais células evitam a morte por apoptose, que é um dos principais mecanismos de ação dos quimioterápicos usados atualmente na clínica (YUAN *et al.*, 2017).

Dessa forma, existe a necessidade de se obter novas drogas antineoplásicas, que consigam driblar a resistência a multidrogas desenvolvida pelas células tumorais, obtendo-se resultados eficientes e seguros no tratamento dessa patologia. Neste contexto, os produtos naturais têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de novos quimioterápicos (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Dentre os quimioterápicos derivados diretamente dos produtos naturais, pode-se citar os alcalóides extraídos da *Catharanthus roseus*, vinblastina e vincristina, que são usados no tratamento de linfoma de Hodgkin, Sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículo e leucemia linfoblástica infantil. Há também o paclitaxel, isolado da casca de *Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*, sendo atualmente indicado para o tratamento de diferentes tipos de tumores sólidos, como o câncer de mama, de pulmão e ovário, uma vez que atua inibindo o crescimento do tumor através da interrupção do ciclo celular (Figura 1) (BRANDÃO *et al.*, 2010; WANDERLEY *et al.*, 2018).

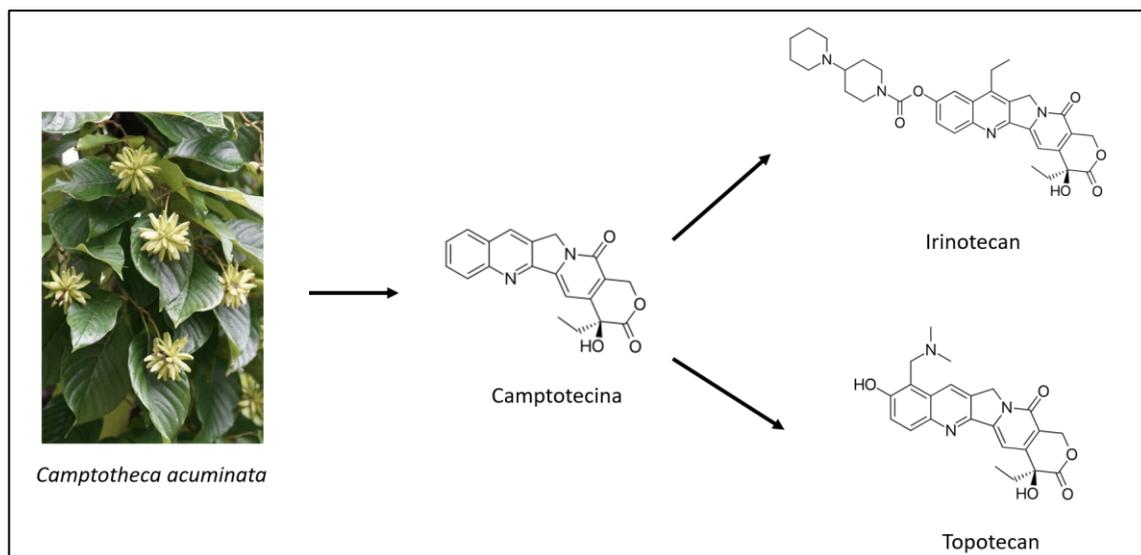


Figura 2: Quimioterápicos semi-sintéticos, baseados em estrutura natural.

Dessa forma, torna-se evidente que os produtos de origem natural apresentam uma rica variedade de biomoléculas com atividade antineoplásica. E que apesar de existirem diferentes drogas para essa finalidade no mercado, ainda existe a necessidade de se obter novos tipos de tratamento, já que o câncer continua sendo uma patologia extremamente letal.

1.2 O CÂNCER CERVICAL

O termo câncer cervical ou câncer de colo do útero é utilizado para descrever um tipo específico de câncer em que há o crescimento de tumores na extremidade inferior do útero, os quais se desenvolvem a partir de alterações celulares anormais na região denominada abertura do colo do útero. A replicação desordenada do epitélio que reveste o órgão, compromete não só o tecido subjacente, como também é capaz de invadir outras estruturas e órgãos. Os carcinomas invasores do colo do útero podem ser classificados em duas categorias: carcinoma epidermoide (tipo mais incidente – cerca de 90% dos casos – que acomete o epitélio

escamoso) e adenocarcinoma (tipo raro – cerca de 10% dos casos – que acomete o epitélio glandular) (INCA, 2023).

A principal causa de lesões cervicais pré-cancerosas e de carcinomas cervicais é a infecção por papilomavírus humano, o HPV, que causa mais de 99% dos cânceres cervicais, representando então a infecção sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo (CROSBIE *et al.*, 2013; RERUCHA *et al.*, 2018). O HPV também é o agente infeccioso que mais causou câncer em mulheres do ano de 2020, com prevalência de 660 mil casos (WHO, 2023). Apesar de a maioria das infecções por HPV desaparecerem espontaneamente, as infecções persistentes por HPV de alto risco estão fortemente relacionadas com o aparecimento de diversos tipos de câncer como no colo de útero, vulva, vagina, ânus, pênis e orofaringe. Os fatores de risco que contribuem para a persistência do vírus são: imunodeficiência, uso prolongado de contraceptivos orais, tabagismo, infecções por *Chlamydia trachomatis* e o tipo de HPV envolvido. Os tipos de HPV de alto risco mais comuns, ou seja, os vírus considerados provavelmente carcinogênicos, são dos tipos 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52 e 58, sendo o tipo 16 o mais relacionado ao câncer cervical (CROSBIE *et al.*, 2013; INCA, 2023).

O HPV é capaz de infectar o epitélio e se replicar em células epiteliais maduras, interrompendo então o controle normal do ciclo celular, levando a divisão celular descontrolada, bem como o acúmulo de dano genético (CROSBIE *et al.*, 2013). Os estágios iniciais da infecção por HPV normalmente são assintomáticos, uma vez que se necessita de muitos anos para que as células anormais se desenvolvam em câncer cervical. Portanto, somente nos estágios mais avançados do câncer do colo de útero, os sintomas mais significativos começam a aparecer. Os sintomas incluem sangramento anormal (após relações sexuais, entre períodos

menstruais e após a menopausa), corrimento vaginal, dor no abdômen e pelve, dor ao urinar entre outros (COHEN *et al.*, 2019).

Atualmente, o tratamento para o câncer cervical envolve quimioterapia, radioterapia e intervenção cirúrgica, os quais podem ser empregados de forma isolada ou em conjunto. O tratamento cirúrgico é usado nos estágios iniciais da doença e tem como objetivo remover o câncer e todo o tecido comprometido ao seu entorno. Nestes casos são utilizados três tipos de intervenções cirúrgicas: conização (retirada de uma área do colo de útero), histerectomia simples (retirada do útero) e histerectomia radical (retirada do útero, dos tecidos ao seu redor e dos linfonodos). A radioterapia é utilizada em todos os estágios da doença ou após uma cirurgia e tem como objetivo destruir as células cancerosas com radiação. Já a quimioterapia utiliza medicamentos, como a Carboplatina e Paclitaxel, para destruir o câncer, sendo empregada em vários estágios da doença incluindo nos casos de metástase (INCA, 2023; WHO, 2023).

A incidência desse tipo de câncer é bastante significativa, com aproximadamente 604 mil novos casos no ano de 2020 em todo o mundo, sendo o quarto tumor maligno mais comum entre as mulheres, ficando atrás do câncer de mama, colorretal e de pulmão. O câncer cervical também foi responsável por 341 mil óbitos em 2020 no mundo todo. Em 2040 estima-se que a incidência deste tipo de câncer seja de 798 mil novos casos com cerca de 481 mil óbitos (INCA, 2023; WHO, 2023). Portanto, existe a necessidade de desenvolver pesquisas sobre novos tratamentos para essa patologia. Nesse sentido, os estudos envolvendo a elucidação de compostos de origem natural com atividade anticancerígena, são muito bem-vindos, pois representam uma esperança para a medicina humana e principalmente para os pacientes, que sofrem diretamente com essa patologia.

1.3 A IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS NA FARMACOLOGIA

Os produtos naturais, sejam eles originados de fontes vegetais, animais ou de microorganismos, representam um papel fundamental no desenvolvimento da medicina tradicional, uma vez que têm sido usados pela medicina popular de diferentes civilizações ao longo de diversos anos (NEWMAN e CRAGG 2020). Segundo registros encontrados na Mesopotâmia, datados de 2600 a.C., produtos naturais de origem vegetal eram usados para o tratamento de diferentes enfermidades como resfriados e parasitoses. Devido a essas diferentes propriedades biológicas, como por exemplo as propriedades antibacteriana, anticoagulante e anticancerígena, muitos desses produtos naturais, continuam sendo usados atualmente pela civilização moderna (BORCHARDT,2002), uma vez que possuem a capacidade de tratar uma enorme variedade de doenças que acometem humanos, variando desde doenças como Alzheimer, Parkinson, câncer, epilepsia, até doenças como rinite alérgica, infecções fúngicas e bacterianas (NEWMAN e CRAGG 2020).

Portanto, as substâncias de origem natural representam uma das mais antigas fontes de medicamentos para o homem. Devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos pelos vegetais, essas substâncias constituem uma fonte efetiva de potenciais novos fármacos. Dessa forma, muitos medicamentos hoje comercializados são derivados diretamente ou indiretamente dos vegetais. No primeiro caso o princípio ativo é isolado dos produtos naturais, já no segundo caso o princípio ativo é sintético, mas com grupos farmacofóricos baseados em estruturas naturais. Com isso, existe atualmente um grande avanço nos estudos envolvendo a análise fitoquímica e farmacológica de plantas medicinais, visando a

obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas (CECHINEL FILHO *et al.*, 1998; NEWMAN e CRAGG 2020).

Os metabólitos secundários são produzidos pelos vegetais com intuito de viabilizar a sua sobrevivência, como por exemplo, os mecanismos de proteção contra predadores e patógenos. No entanto, há a produção de diferentes estruturas químicas que desempenham atividades biológicas distintas, contribuindo para a prevenção e tratamento de diversas enfermidades humanas (CRUZ e KAPLAN; 2004; BERNARDINI *et al.*, 2018). Logo, muitas dessas substâncias contribuíram para o desenvolvimento de medicamentos modernos mais eficientes, como por exemplo a procaína e o ácido acetil salicílico, que são amplamente utilizados pela medicina (PINTO *et al.*, 2002; NEWMAN e CRAGG 2020).

Apesar de produtos naturais possuírem diversas atividades biológicas, alguns fatores devem ser levados em consideração para que as substâncias ativas sejam isoladas de forma efetiva, podendo então alcançar o uso clínico. Esses fatores são relacionados a época da coleta, clima e solo em que o vegetal se encontra, os métodos de identificação e isolamento de compostos, além dos testes de eficácia terapêutica (testes pré-clínicos, clínicos e de toxicidade). Além disso as informações sobre o uso e o conhecimento tradicional associado as espécies vegetais representam um bom indicativo de uma possível propriedade terapêutica, uma vez que dados na literatura comprovam que é mais provável encontrar substâncias ativas em plantas já utilizadas pela população do que em plantas escolhidas ao acaso (CECHINEL FILHO *et al.*, 1998; SECA e PINTO, 2018).

1.4 FAMÍLIA *Myrtaceae* E O GÊNERO *Myrciaria*

A família *Myrtaceae* é uma família de angiosperma, importante pelo seu tamanho e importância. Espécies dessa família estão distribuídas ao longo de diversas regiões (tropicais, subtropicais e temperadas) devido seu extenso potencial adaptativo. Essa família apresenta elevada riqueza de espécies, com cerca de 6.000 espécies reunidas em 140 gêneros, predominando os gêneros *Myrciaria*, *Eugenia* e *Calyptanthus*. Além disso, possui grande importância na fitossociologia das florestas do Brasil, como as das regiões sul e sudeste (KURTZ e ARAÚJO, 2000; CRUZ e KAPLAN, 2004; SOBRAL *et al.*, 2015).

Espécies dessa família são usadas pela medicina popular, fato que acaba impulsionando diversas pesquisas sobre suas propriedades biológicas, como anti-inflamatória, citotóxica e antinociceptiva (CRUZ e KAPLAN, 2004; SANDHAR *et al.*, 2011). Tais propriedades terapêuticas observadas, muitas vezes estão relacionadas a compostos bioativos resultantes do metabolismo secundário vegetal, como os flavonoides, flavonóis, taninos e catequinas (SANDHAR *et al.*, 2011; ÁVILA *et al.*, 2016; MORESCO *et al.*, 2016).

Um dos gêneros predominantes dessa família é o gênero *Myrciaria*, sendo nativo do Brasil e amplamente distribuído no território brasileiro e presente nos biomas: Caatinga, Cerrado, Amazônia, Mata Atlântica e os Pampas. Atualmente existem nesse gênero, 25 espécies aceitas (SOBRAL *et al.*, 2015; FLORA DO BRASIL, 2023). Diversos compostos já foram isolados de espécies do gênero *Myrciaria*, da mesma maneira que atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiparasitária e antifúngica, já foram descritas na literatura. (PEREIRA *et al.*, 2022).

1.5 *Myrciaria glazioviana*

A *Myrciaria glazioviana* (Kiaersk.) G.M. Barroso ex Sobral, é uma espécie brasileira, pertencente à Família *Myrtaceae* e ao gênero *Myrciaria* (Figura 3). Apresenta folhas com tamanho superior à 60 mm, de forma lanceolada. Os frutos apresentam formato globoso, uma semente em seu interior e superfície não glabra, ou seja, apresenta pelos (SOBRAL *et al.*, 2015; PACHECO-SILVA e DONATO, 2016).



Figura 3 – Imagens de *M. glazioviana* (folhas, frutos e sementes), espécie vegetal pertencente à família *Myrtaceae*. Apresentam folhas lanceoladas ou elípticas e frutos globosos com pelos em sua superfície e uma semente.

Esta espécie apresenta diferentes sinônimos como: *Plinia glomerata*, *Eugenia cabeluda*, *Eugenia tomentosa* e *Myrciaria glomerata*. Sendo nativa e endêmica do Brasil, encontrada no bioma Mata Atlântica e distribuída no Nordeste, Sudeste e Sul do país (Figura 4). Apresenta diferentes nomes populares, dependendo da região onde se encontra, como por exemplo: Cabeludinha, Jabuticaba-amarela, Peludinha e Fruta Cabeluda (BAGATTOLI *et al.*, 2016; PACHECO-SILVA e DONATO, 2016; FLORA DO BRASIL, 2023).

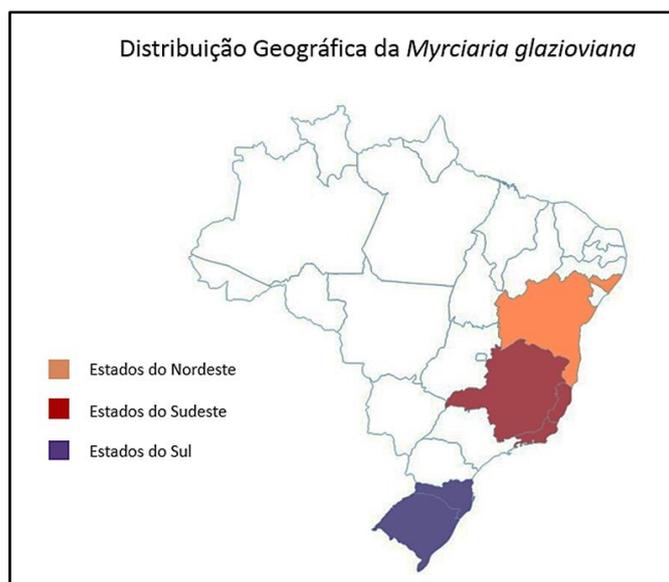


Figura 2: Distribuição geográfica da *M. glazioviana*. Esta espécie tem ocorrências confirmadas nas regiões: Nordeste (Alagoas e Bahia), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro) e no Sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina). Adaptado de FLORA DO BRASIL, 2023.

Há poucos estudos científicos envolvendo a *M. glazioviana*. O primeiro estudo publicado na literatura descreveu um alto teor de ácido ascórbico nos frutos dessa espécie, através do método 2:6-diclorofenol-indofenol (MALAVOLTA *et al.*, 1956). Um estudo mais recente realizado com o extrato acetônico da parte aérea da *M. glazioviana* descreveu o isolamento e identificação de quercitrina e duas derivações do ácido flavelágico (3,4,3'-trimetóxi-flavelágico-4'-O-glicosídeo, ácido 3,4,3'-trimetóxi-flavelágico) (Figura 5), além de reportar atividade antinociceptiva dos extratos acetônico e metanólico e dos compostos isolados no modelo *in vivo* de constrição abdominal induzido por ácido acético (SERAFIN *et al.*, 2007a). Foi observado uma redução significativa do número de constrições abdominais dos animais tratados intraperitonealmente com as amostras em comparação com o grupo controle. Nesse sentido, foram calculados os valores de ID₅₀, ou seja, a dose de extratos ou compostos isolados que possui a capacidade de reduzir a resposta em 50%, em relação ao controle. Dessa forma, observou-se os valores de ID₅₀ de 24,8 µmol/kg para o extrato acetônico, 3,3 µmol/kg para o extrato metanólico e 10,8

e 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ para os compostos isolados ácido 3,4,3'-trimetóxi-flavelágico e 3,4,3'-trimetóxi-flavelágico-4'-O-glicosídeo, respectivamente. (SERAFIN *et al.*, 2007a).

A propriedade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias puras isoladas das folhas e caules da *M. glazioviana* contra bactérias e fungos patogênicos contra humanos foi avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória (MIC) através do método de diluição em ágar. Dessa forma, foi possível observar que a fração acetato de etila foi efetiva contra *Staphylococcus aureus* e dermatófitos. A fração aquosa apresentou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e dermatófitos. O extrato metanólico apresentou atividade somente contra os fungos dermatófitos. Já os compostos isolados (ácido 3,4,3'-trimetóxi-flavelágico e 3,4,3'-trimetóxi-flavelágico-4'-O-glicosídeo) possuem atividade antimicrobiana contra todos os microorganismos testados (SERAFIN *et al.*, 2007b).

A propriedade analgésica dos extratos metanólico e acetônico de *M. glazioviana* e seus compostos fenólicos isolados previamente foi avaliada através de diferentes testes de nocicepção *in vivo*, obtendo resultados promissores (FISCHER *et al.*, 2008). Outro estudo demonstrou que os compostos fenólicos presentes na semente, polpa e casca dos frutos de *M. glazioviana* apresentam potente atividade antioxidante (BAGATTOLI *et al.*, 2016). Estudos recentes elucidaram as atividades anti-edematogênica (através do modelo de edema de pata induzida por carragenina), antinociceptiva (através do modelo de constrição abdominal induzida por ácido acético) e o potencial hepatoprotetor (por análises histológicas) do extrato diclorometano de folhas de *M. glazioviana*, e a anotação dos compostos ácidos gálico e quínico por espectrometria de massas (PEREIRA *et al.*, 2019). Foi observado então que o extrato diclorometano foi capaz de inibir a

formação de edema provocado pela inflamação induzida pela carragenina na concentração de 250 mg/Kg, a amostra inibiu também o número de contorções abdominais nas concentrações de 125 e 250 mg/kg quando comparada com o controle negativo, além disso, essa amostra na concentração de 250 mg/kg foi capaz de proteger os hepatócitos dos animais em relação a formação de degeneração hidrópica proveniente do processo inflamatório (PEREIRA *et al.*, 2019).

O extrato etanólico dos frutos de *M. glazioviana* foi avaliado em relação a sua atividade anti-inflamatória através do modelo de edema de pata induzida por diferentes agentes indutores. Observou-se então que a amostra nas concentrações de 125 e 250mg/kg foi capaz de inibir a formação de edema nos modelos que utilizam carragenina, prostaglandina E2 e composto 48/80. Esses resultados sugerem que a amostra atua inibindo COX e como antagonista dos receptores de histamina e serotonina (H1 e 5-HT2), além de inibir os mastócitos durante a resposta inflamatória (PEREIRA *et al.*, 2020). Através de espectrometria de massa foi possível anotar os compostos quercetina, dihidroquercetina, ácido gálico, ácido quínico e ácido ascórbico no extrato etanólico dos frutos de *M. glazioviana* bem como em sua fração acetato de etila (Figura 5) (PEREIRA *et al.*, 2020). Desse modo, diante do potencial farmacológico dos extratos de *M. glazioviana*, o presente trabalho buscou ampliar os conhecimentos sobre esta espécie tão pouco estudada,

visto que os produtos naturais e a fitoterapia têm muito a contribuir no tratamento de diversas patologias.

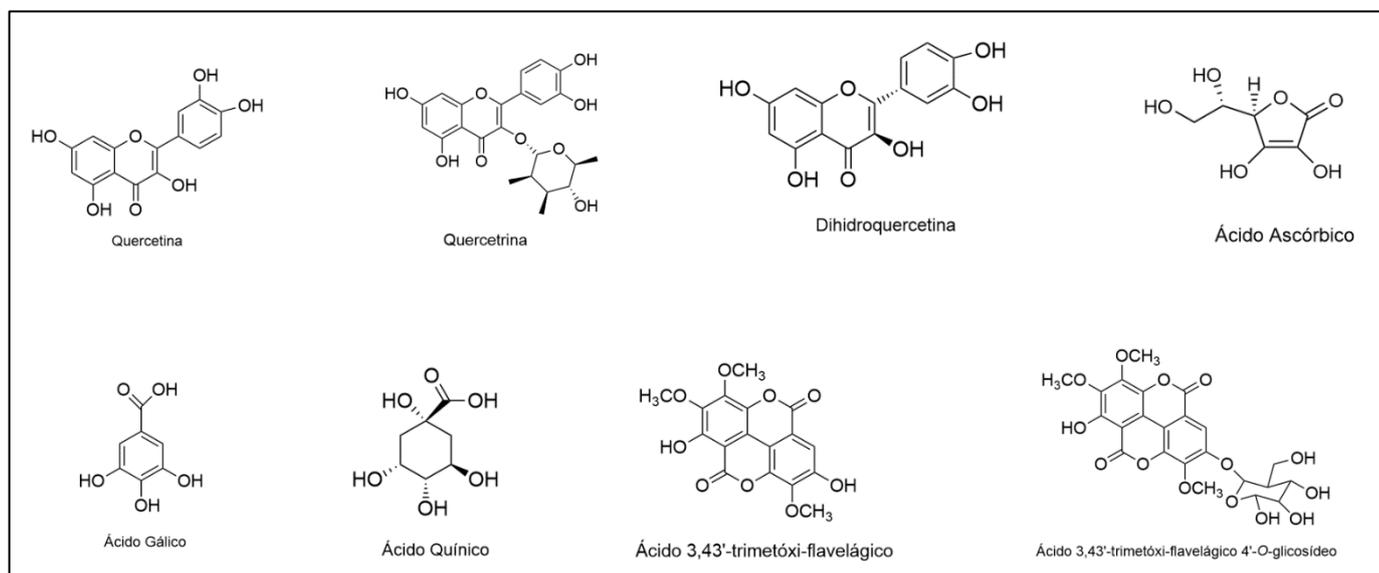


Figura 5: Compostos descritos e/ou isolados de *Myrciaria glazioviana* em estudos previamente publicados na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biológico antiproliferativo dos extratos brutos e frações de *M. glazioviana*, bem como de seus compostos isolados frente à linhagem de câncer cervical (células HeLa).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS - CAPÍTULO 1

- Obter os extratos brutos das folhas e frutos de *M. glazioviana* por maceração exaustiva e obter suas frações através da partição líquido-líquido.
- Anotar os compostos presentes nos extratos brutos e frações através das técnicas de Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS).
- Avaliar a viabilidade celular dos extratos brutos e frações de *M. glazioviana* através do ensaio *in vitro* de Atividade Metabólica Colorimétrica de MTT utilizando as linhagens de câncer cervical humano (HeLa) e fibroblasto murino (NIH/3T3).
- Calcular o Índice de Seletividade das amostras através da relação dos valores de IC₅₀ obtidos para as duas linhagens celulares.
- Avaliar o efeito dos extratos e frações sobre a migração celular através do ensaio de migração celular (*Wound Healing Assay*).
- Avaliar a ativação das Caspases 3 e 7 dos extratos e frações através de modelo *in vitro*.

- Analisar os efeitos dos extratos e frações sobre o ciclo celular por citometria de fluxo.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS CAPÍTULO 2

- Obter o extrato diclorometânico das folhas de *M. glazioviana* através do processo de maceração exaustiva.
- Isolar os compostos bioativos presentes no extrato diclorometânico através de técnicas de fitoquímica clássica.
- Identificar e caracterizar os compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e anotar os compostos em seu extrato de origem por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS)
- Avaliar a viabilidade celular dos compostos isolados e seu extrato de origem através do ensaio *in vitro* de Atividade Metabólica Colorimétrica de MTT utilizando as linhagens de câncer cervical humano (HeLa) e fibroblasto murino (NIH/3T3)
- Calcular o Índice de Seletividade das amostras através da relação dos valores de IC₅₀ obtidos para as duas linhagens celulares
- Analisar os efeitos dos extratos e frações e dos compostos isolados sobre o ciclo celular por citometria de fluxo
- Investigar os possíveis alvos farmacológicos dos compostos isolados através de Target Fishing.

3. CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO BRUTO DE *M. glazioviana* E DE SUAS FRAÇÕES

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Frutos e folhas de *M. glazioviana* foram coletados em seu habitat natural na cidade de Nova Friburgo – Rio de Janeiro, Brasil (22°17'02.6"S 42°31'29.9"W). A coleta das folhas foi realizada no dia 04 de abril de 2014, sob as seguintes condições meteorológicas: temperatura média (20,4°C), precipitação (4mm), umidade relativa mínima (59%) e umidade relativa máxima (97%) (AGRITEMPO, 2023). Já os frutos foram coletados no dia 07 de novembro de 2014, sob as condições meteorológicas: temperatura média (19,45°C), precipitação (3,6mm), umidade relativa mínima (54%) e umidade relativa máxima (96%) (AGRITEMPO, 2023). O material vegetal foi identificado pelo taxonomista Dr. Gustavo Shimizu do Instituto de Biologia da Unicamp – SP, e uma exsicata foi depositada no herbário da mesma instituição sob o nº 201074 (Figura 6).

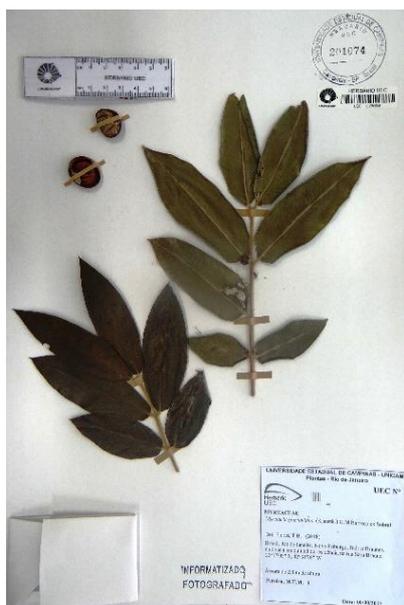


Figura 6: Exsicata da *M. glazioviana*, depositada no herbário da Universidade Estadual de Campinas, sob o número UEC 201074.

Além disso a atividade de acesso ao Patrimônio Genético, foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, sob número AA6B8C3.

3.1.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *M. glazioviana*

As folhas de *M. glazioviana* foram estabilizadas e secas em estufas de ar circulante à temperatura de 40°C, pulverizadas e maceradas com diclorometano, na proporção pó/solvente de 1:5 (massa/volume), até a exaustão. Os frutos de *M. glazioviana*, frescos e sem sementes, foram submetidos ao processo de maceração exaustiva com etanol em uma proporção fruto/solvente de 1:5 (m/v). Em seguida, todo o solvente das soluções obtidas foi removido com auxílio de um rotaevaporador. Dessa forma foram obtidos os extratos brutos de folhas e de frutos de *M. glazioviana* (extrato diclorometânico das folhas – MGD e extrato etanólico

dos frutos – MGEFr), os quais foram acondicionados em frasco âmbar, guardados refrigerados e sem luz direta (Figura 7).



Figura 7: Esquema da metodologia da obtenção dos extratos brutos das folhas e frutos de *M. glazioviana*.

Parte do extrato diclorometânico das folhas de *M. glazioviana* (MGD) foi dissolvido em metanol:água na proporção 9:1 (v/v) e em seguida submetidos à partição líquido-líquido seguindo a série eluotrópica com polaridade crescente. Dessa forma, inicialmente foi feita a partição com hexano e acrescentou-se 40% de água à solução hidroalcoólica remanescente e prosseguiu-se a partição com acetato de etila (Figura 8). A extração com cada solvente foi repetida três vezes. Dessa forma, ao final de todo o processo, obteve-se a partir das folhas de *M. glazioviana*, o extrato bruto diclorometânico (MGD) e as frações hexânica (MGHex), acetato de etila (MGA) e hidroalcoólica (MGH).

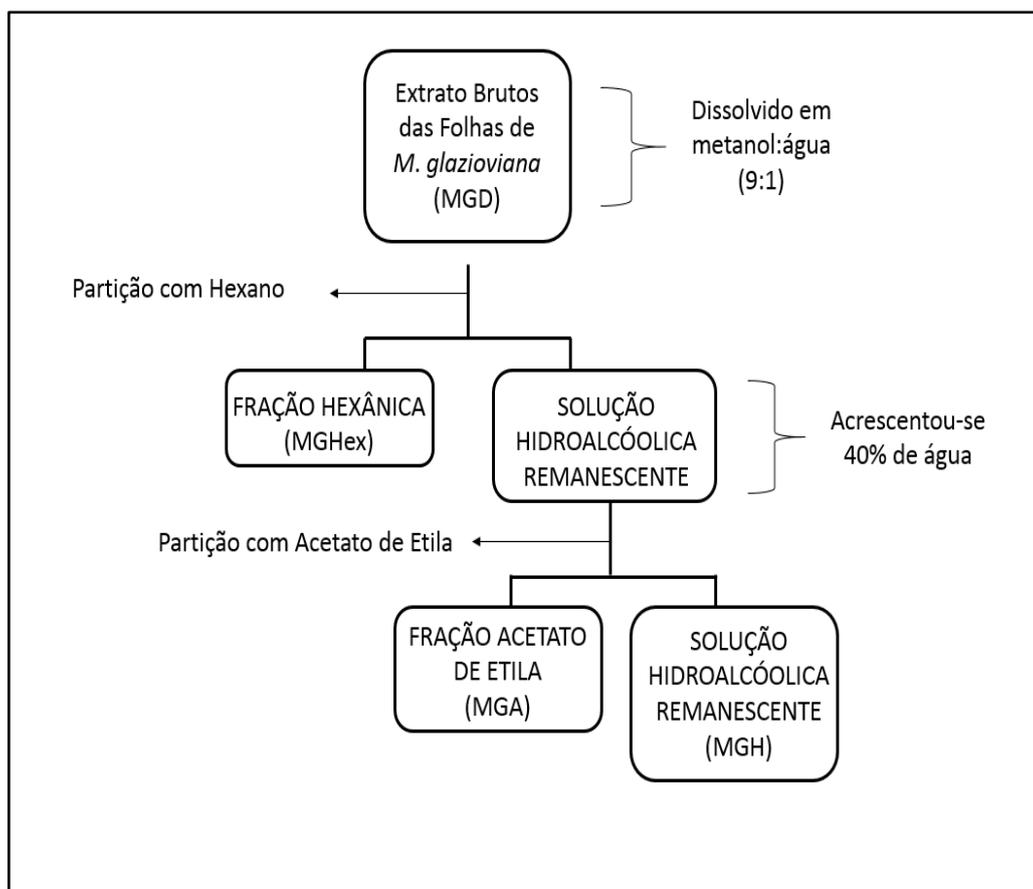


Figura 8: Esquema da metodologia da partição líquido-líquido do extrato bruto das folhas de *M. glazioviana* (MGD), para a obtenção das frações hexânica (MGHex), acetato de etila (MGA) e hidroalcoólica (MGH).

3.1.3 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DAS SUBSTÂNCIAS POR LC-MS

Aproximadamente 2,0 mg de cada amostra (MGD e MGA) foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol:ácido fórmico, CH₃OH:HCOOH (0,1%), centrifugados por 10 minutos e injetados no Cromatógrafo Líquido (LC). Foi utilizado um Sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência Shimadzu® (Kyoto, Japão), acoplado a um detector seletivo de massa modelo micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) para realizar a análise ESI-HRMS/MS. A separação em LC foi realizada em uma coluna analítica Shimadzu XR-ODS C18 de 75mm x 2,1mm, com tamanho de partícula de 2,1 µm (Shimadzu, Kyoto, Japão). As injeções (20µL) foram realizadas utilizando um autosampler. A fase móvel consistia de ácido fórmico a 0,1% em água (solvente A)

e metanol (solvente B). O perfil de eluição foi o seguinte: 0,0–16,0 min (40-70% B); 16,0–40,0 min (70–100% B); 46,0–50,0 min (100% B); 50,0–55,0 min (100–40% B); 55,0–60,0 min (40% B); com uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min. Os parâmetros de análise são os seguintes: voltagem do capilar de 4,5 kV, ESI no modo positivo e negativo, deslocamento final da placa em 500 V, nebulizador a 40 psi, gás seco (N₂) com uma taxa de fluxo de 8 mL/min e temperatura de 200 °C. A fragmentação por CID foi obtida no modo auto MS/MS. Os espectros foram registrados no intervalo de m/z 100–1200.

3.1.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *M. glazioviana*

3.1.4.1 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT – CÉLULAS HELA E NIH/3T3

Para determinar a viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de atividade metabólica colorimétrica de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). Este experimento foi realizado com duas linhagens celulares: fibroblasto murino NIH/3T3 (para avaliar se há efeitos citotóxicos) e células de câncer cervical humano HeLA (para avaliar a atividade metabólica frente esta linhagem). As células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco, Thermo Fisher, Paisley, UK) com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab, São Paulo, BR) em estufa à 37°C com 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas de cultura (Nest Biotechnology Co., Jiangsu, China) de 96 poços, 5x10³ células/poço e após 24h foram tratadas com os compostos (extratos, frações e o controle positivo, Cloridrato de Doxorrubicina (Libbs Farmacêutica Ltda, São Paulo, BR)) dissolvidos em meio DMEM com 1% de DMSO (Labsynth, São Paulo, BR) em diferentes concentrações. Também foi feito o ensaio tratando as células com DMSO nas concentrações

equivalentes as utilizadas para a diluição das demais amostras, com o objetivo de comprovar que o mesmo não altera a viabilidade celular.

As placas foram incubadas à estufa à 37°C com 5% de CO₂. Após 48h do tratamento, o meio foi retirado e acrescentado a solução de MTT (0,3mg/mL, 100µL/poço) (Invitrogen, Thermo Fisher, Oregon, USA) e a placa levada à estufa por 4 horas, após este período, a solução de MTT foi retirada e os cristais de formazan foram dissolvidos com DMSO. As células tratadas apenas com o veículo foram consideradas tendo 100% da viabilidade celular. As placas foram lidas em ELISA Epoch-Biotek (BioTek Instruments, Vermont, USA) à λ=570nm. A análise bioestatística dos dados obtidos foi realizada no software GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software, California, USA), através do teste OneWay ANOVA seguido pelo Teste de Dunnet, p < 0,05. Os experimentos foram realizados em triplicata. As amostras que apresentaram IC₅₀ menor que 30 µg/mL foram utilizadas nos próximos experimentos.

3.1.4.2 CALCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O Índice de Seletividade (IS), mede o quanto uma amostra ou composto é ativo contra uma linhagem de câncer sem causar danos às células não tumorais. Um medicamento ideal deve apresentar uma alta concentração tóxica em contraste com uma baixa concentração ativa, ou seja, a droga precisa ter a capacidade de causar a morte do câncer, sem afetar células normais. Dessa maneira, o SI é medido através da razão entre o IC₅₀ de células não tumorais e o IC₅₀ de células tumorais, como fica expresso na equação:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ célula não tumoral}}{IC_{50} \text{ célula tumoral}}$$

Amostras com IS ≥ 2 podem ser assumidas como tendo um potencial anticâncer e moderada seletividade, portanto, aptas para estudos posteriores (RADHA ABBAS HASOON *et al.*, 2021). Valores de IS acima de 2 pode ser um bom parâmetro para minimizar os efeitos tóxicos sobre tecidos que estão normalmente em proliferação, como pele e medula óssea.

3.1.4.3 EXPRESSÃO DA ATIVAÇÃO DAS CASPASES EFETORAS 3/7, PERMEABILIDADE CELULAR E MORFOLOGIA DE MORTE CELULAR

A expressão da ativação das caspases efetora 3/7, permeabilidade celular e morfologia de morte celular foram avaliadas, conforme descrito em Fonseca *et al.*, 2020, utilizando linhagem celular HeLa. As células foram semeadas em placas de 24 poços (2×10^4 células/poço) e incubadas por 24 horas. Em seguida, foram tratados com 2 vezes a concentração do IC₅₀ dos extratos ou controle negativo (DMSO) e com Cell Event™ Caspase-3/7 Green Ready Probes™ Reagent com 2 gotas/ml (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA). No tempo indicado, as células foram coradas com iodeto de propídio (PI) 10µg/ml (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) e Hoechst 5µg/ml (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) por 10 minutos em tampão fosfato. As células foram observadas e fotografadas sob microscópio invertido de fluorescência, Zeiss Axio Observer, a cada 12h para determinar o momento que há o início da ativação das caspases 3/7. Para quantificação percentual, pelo menos um total de 500 células em 4 campos diferentes foram contados usando campo claro (DIC) para o número total de células apoptóticas e caspases 3/7 ativas, no software ImageJ (National Institute of Health, EUA), em pelo menos três experimentos independentes.

3.1.4.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (*Wound Healing Assay*)

Células HeLa foram semeadas em placa de 24 poços, na concentração de $7,5 \times 10^4$ células/poço em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Quando a confluência máxima foi atingida, com o auxílio de uma ponteira (tip 200µL) foi realizado um risco contínuo na superfície medial de cada poço, ocasionando ruptura do contato entre as células e retirada destas nesta região do poço, resultando em uma lesão mecânica em monocamada. O meio de cultura foi então retirado, os poços foram lavados com PBS em seguida foi adicionado meio DMEM com privação soro fetal bovino (0,2%).

Após 24h as amostras foram dissolvidas em meio de cultura DMEM, 0,2% SFB, na concentração próxima ao IC₅₀, aplicados nos poços, de acordo com cada tratamento. Foi utilizado o fármaco Cloridrato de Doxorrubicina como controle positivo e meio de cultura (0,2% SFB) como controle negativo. Os poços foram fotografados ao microscópio EVOS™ XL Core Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA) em um aumento de 10x, antes da aplicação do tratamento (T0) e após 12 e 24h do tratamento (T1 e T2 respectivamente). As imagens foram analisadas com o software ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA), para a obtenção da área livre de migração celular em porcentagem (%) e os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prism através do teste de OneWay ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet. Foi considerado $p < 0,05$ como significativo.

3.1.4.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS HeLa

Células HeLa foram semeadas em placas com 6 poços (2×10^5 células/poço), após 24h foram submetidas aos tratamentos com as amostras (extratos e frações)

e cloridrato de doxorubicina na concentração equivalente ao IC₅₀, por 48h. Como controle negativo foram utilizadas células tratadas somente com DMEM. Após estes procedimentos, as células foram coletadas dos poços com uso de tripsina, centrifugadas e ressuspensas e fixadas em 4,5mL de etanol 70%. As células contidas na suspensão de etanol 70% foram centrifugadas e o precipitado ressuspensado em 1 mL de uma solução corante de iodeto de propídio (PI). Em seguida, as amostras foram incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz e em seguida analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus para que seja avaliada o conteúdo de DNA e o ciclo celular. Os histogramas das amostras foram analisados através do programa Cell Quest Pro. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prism através do teste de TwoWay ANOVA, considerado $p < 0,05$ como significativo.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT EM CÉLULAS HeLa

O efeito dos extratos e frações de *M. glazioviana* sobre a viabilidade celular de células das linhagens HeLa e NIH/3T3 foi avaliado através da atividade metabólica colorimétrica de MTT. Foi determinado também os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir a proliferação celular de 50% das células) das amostras testadas.

O extrato bruto dos frutos (MGEFr), apresentou diferença estatística quando comparado ao veículo (100% de viabilidade celular), somente na maior concentração, 250 µg/mL, com viabilidade celular de 2,04%. As demais concentrações não apresentaram diferença estatística quando comparado com o veículo (Figura 9). Dessa forma, o IC₅₀ dessa amostra foi de 146,4 µg/mL.

Na figura 9 também é possível observar a viabilidade celular após o tratamento com o extrato bruto das folhas (MGD). Neste experimento, todas as concentrações utilizadas do extrato foram estatisticamente significantes quando comparadas com o veículo, ou seja, nos grupos tratados com o extrato, a viabilidade celular foi menor. A porcentagem de células viáveis para essa amostra variou de 73,47% na concentração mais baixa (3,9 µg/mL) até 0,47% na concentração mais alta (250 µg/mL). O IC₅₀ dessa amostra foi de 24,31 µg/mL.

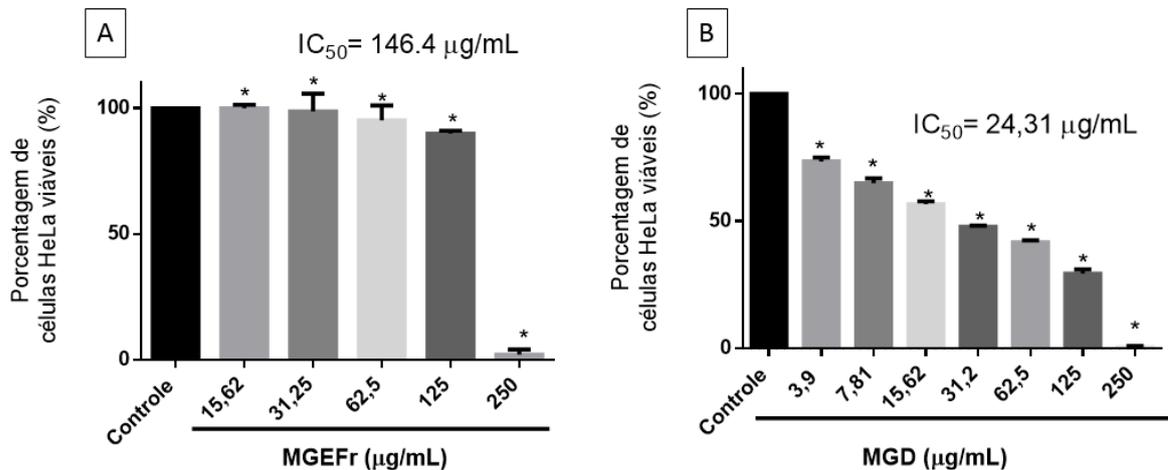


Figura 9: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de câncer cervical (HeLa) após o tratamento com as amostras MGEFr (A) e MGD (B). Dados apresentados como média \pm SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, * $p < 0,05$ considerado significativo.

A fração hexânica do extrato bruto das folhas de *M. glazioviana* (MGHex), apresentou diferença estatística quando comparado com o veículo, em todas as concentrações testadas, com exceção da concentração de 15,62 $\mu\text{g/mL}$, onde a porcentagem de células viáveis foi de 87,67%. Na concentração de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade celular foi de 74,94%, já na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, a porcentagem de células viáveis foi de 6,44% (Figura 10). O IC_{50} dessa amostra foi de 75,04 $\mu\text{g/mL}$.

Na figura 10 também é possível observar a viabilidade celular após o tratamento com a fração hidroalcoólica das folhas de *M. glazioviana* (MGH), onde todas as concentrações testadas tiveram diferença estatística quando comparadas com o grupo veículo. Na menor concentração (15,62 $\mu\text{g/mL}$) a porcentagem de células viáveis foi de 76,01%, já na concentração mais alta (250 $\mu\text{g/mL}$), a viabilidade celular foi de 0,98%. O IC_{50} dessa amostra foi de 98,07 $\mu\text{g/mL}$.

A fração acetato de etila do extrato bruto das folhas de *M. glazioviana* (MGA), apresentou diferença estatística quando comparado com o veículo em todas as

concentrações testadas (Figura 10). A porcentagem de células viáveis variou de 85,92% na concentração mais baixa (3,9 µg/mL) até 0,67% e 5,06% nas concentrações de 125 e 250 µg/mL, respectivamente. O IC₅₀ dessa amostra foi de 12,62 µg/mL.

Considerando-se como mais promissoras amostras com IC₅₀ < 30 µg/mL, o extrato MGD e sua fração MGA foram avaliados quanto sua capacidade de interferir na viabilidade celular da linhagem NIH/3T3, no ciclo celular, na migração celular e na ativação de caspases 3/7 de células HeLa, Dessa forma, as análises das amostras MGEFr, MGHex e MGH foram interrompidas.

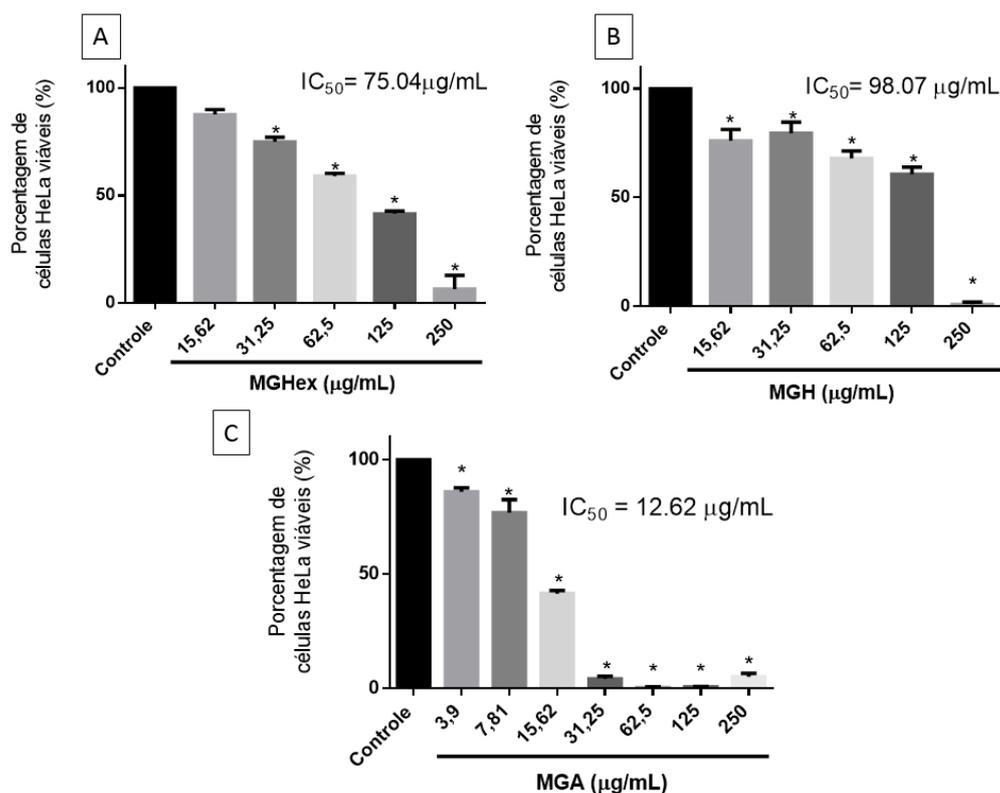


Figura 10: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de câncer cervical (HeLa) após o tratamento com as frações do extrato bruto das folhas de *M. glazioviana*: MGHex (A), MGH (B) e MGA (C). Dados apresentados como média ± SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, *p < 0,05 considerado significativo.

Na figura 11 é possível observar a viabilidade celular após o tratamento com o controle positivo, Cloridrato de Doxorrubicina, onde todas as concentrações testadas diferiram estatisticamente do controle negativo. Na concentração mais baixa de 0,31 $\mu\text{g/mL}$, a porcentagem de células viáveis foi de 61,38%, já na concentração mais alta de 5 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular é de 1,27%. O IC_{50} dessa amostra foi de 1,33 $\mu\text{g/mL}$.

Ao realizar o ensaio de MTT, tratando as células HeLa com DMSO (Figura 11), nas concentrações equivalentes em que a substância é utilizada para diluir as amostras (extratos e frações), é possível perceber que o DMSO foi incapaz de diminuir a viabilidade celular, não apresentando diferença estatística quando comparado ao controle. Dessa forma, não é possível determinar o IC_{50} dessa amostra.

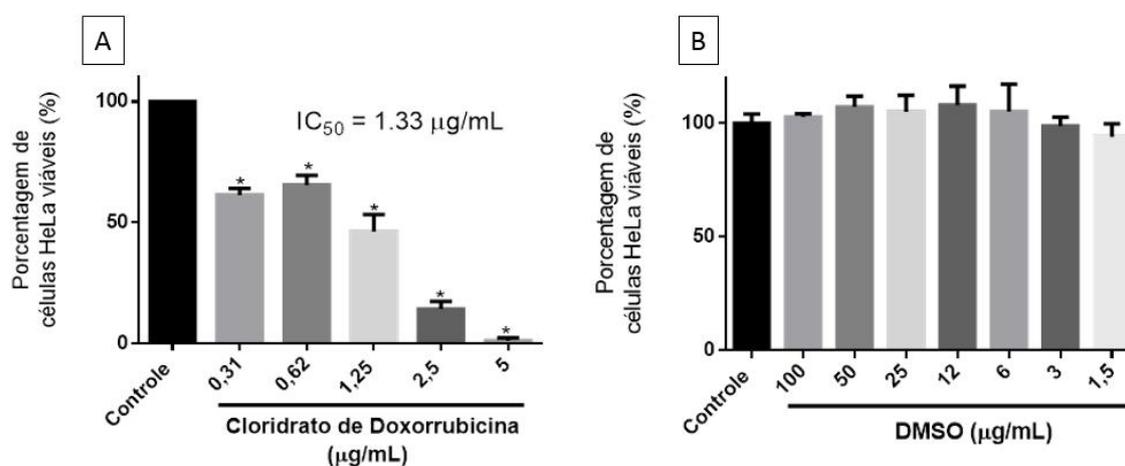


Figura 11: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de câncer cervical (HeLa) após o tratamento com o Cloridrato de Doxorrubicina (A) e Dimetilsulfóxido (DMSO) (B). Dados apresentados como média \pm SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, * $p < 0,05$ considerado significativo.

3.2.2 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT EM CÉLULAS NIH/3T3

Através do ensaio de atividade metabólica colorimétrica de MTT realizada com as células não tumorais de fibroblasto NIH/3T3 pode-se determinar a viabilidade celular bem como o IC₅₀ do extrato MGD, da fração MGA e do Cloridrato de Doxorrubicina (Figura 12).

O extrato MGD apresentou diferença estatística nas concentrações mais altas (31,2 a 250 µg/mL), com porcentagens de células NIH/3T3 viáveis de 78,45 a 0,43%, respectivamente. O valor de IC₅₀ para essa amostra foi de 83,16 µg/mL.

A fração MGA apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle negativo nas concentrações de 31,2 a 250µg/mL, com porcentagens de células viáveis de 79,55 a 0,33% respectivamente. O valor de IC₅₀ para essa amostra foi de 81,9 µg/mL.

O Cloridrato de Doxorrubicina apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo em todas as concentrações testadas, com porcentagens de células NIH/3T3 variando de 74,46% para a menor concentração (0,3 µg/mL) à 0,5% para a concentração mais alta (10 µg/mL). O valor de IC₅₀ para essa amostra foi de 1,39 µg/mL.

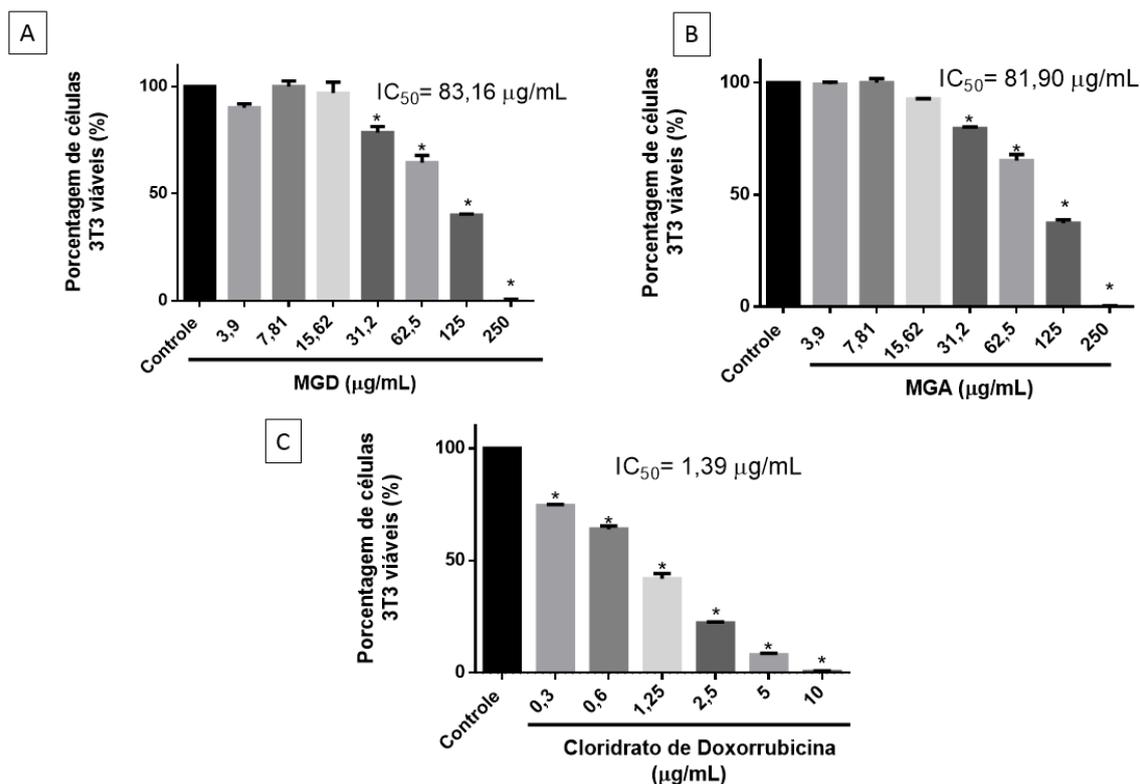


Figura 12: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de fibroblasto NIH/3T3 após o tratamento com MGD (A), MGA (B) e Cloridrato de Doxorubicina (C). Dados apresentados como média ± SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, *p < 0,05 considerado significativo.

3.2.3 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

A partir dos valores de IC₅₀ obtidos pelo ensaio de atividade colorimétrica de MTT em células HeLa e NIH/3T3 foi possível calcular os valores de Índice de Seletividade para as amostras MGD, MGA e Cloridrato de Doxorubicina (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de IC₅₀ para as linhagens celulares HeLa e NIH/3T3 e de Índice de Seletividade (IS) das amostras MGD, MGA e Cloridrato de Doxorubicina

Amostra	IC ₅₀ – HeLa (µg/mL)	IC ₅₀ – NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de Seletividade (IS)
MGD	24,31	83,16	3,42
MGA	12,62	81,90	6,48
Cloridrato de Doxorubicina	1,33	1,39	1,04

3.2.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (WOUND HEALING ASSAY)

A partir das imagens obtidas no modelo de migração celular, foi possível observar que as amostras MGD, MGA e o Cloridrato de Doxorrubicina impediram a migração celular quando comparados ao controle negativo, tendo diferença estatística 24h após os tratamentos (Anexo 1).

Através da análise estatística utilizando a porcentagem da área livre de migração celular, torna-se evidente que até 12h após a aplicação do tratamento (T1), nenhum dos grupos testados apresentou diferença estatística quando comparados com o controle negativo. No entanto, 24h após o tratamento (T2), os grupos tratados apresentaram diferença estatística quando comparados ao controle negativo, ou seja, foram capazes de inibir a migração celular nessa etapa do experimento. O grupo MGA 15 µg/mL apresentou 78,98 e 55,93% de área livre de migração celular, 12 e 24 horas após o tratamento, respectivamente. Para o grupo MGD 30 µg/mL, esses valores foram 83,54 e 59,77% de área livre de migração, nos tempos 1 e 2 respectivamente. Já o grupo Cloridrato de Doxorrubicina 1,75 µg/mL apresentou 75,71% de área livre de migração no tempo 1 e 68,97% no tempo 2 (Figura 13).

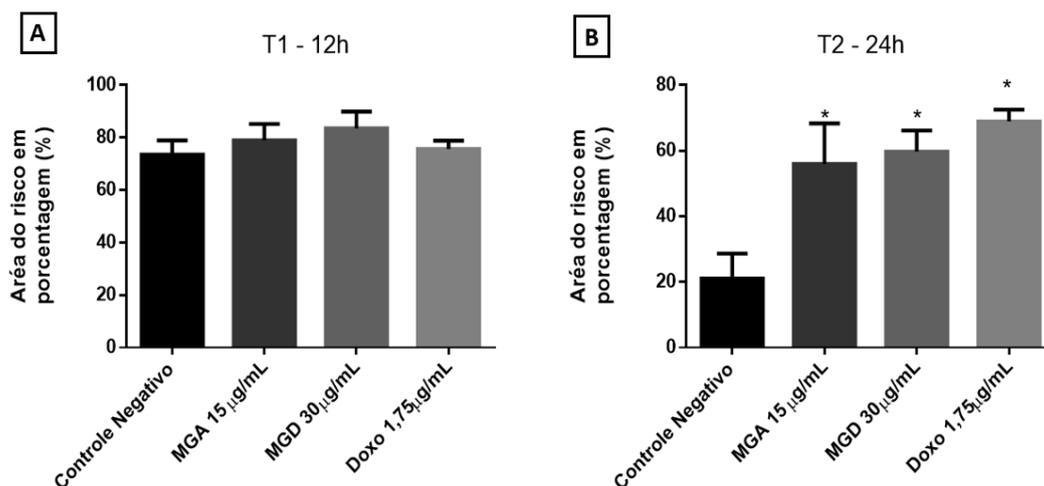


Figura 13: Análise estatística da área do risco em porcentagem (%) nos tempos 1 e 2 do experimento: 12 (A) e 24 (B) horas após o início do tratamento. Dados apresentados como média \pm SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, * $p < 0,05$ considerado significativo.

3.2.5 EXPRESSÃO DA ATIVAÇÃO DAS CASPASES EFETORAS 3/7, PERMEABILIDADE CELULAR E MORFOLOGIA DE MORTE CELULAR

A apoptose é uma das principais vias de morte celular induzida por agentes citotóxicos. Para analisar e comparar os fenótipos de morte celular induzida por cada amostra, foi utilizada a concentração de IC_{50} calculada previamente para células HeLa, conforme detalhado em Zorzaneli *et al.*, 2018. As células HeLa foram tratadas com 2 x IC_{50} de MGA ou MGD e a ativação das caspases efetora 3/7 foi analisada a cada 12h por microscopia de fluorescência. Uma proporção considerável de células com caspases efetoras 3/7 ativa foi observada após 36h de tratamento com ambas as amostras, sendo que MGA induziu ativação das caspases de maneira mais significativa (Figuras 14 A-C). Nesse momento, também é possível notar, através da coloração de Hoescht, que houve mudança significativa na morfologia celular com encolhimento celular, mas com continuidade da integridade da membrana celular, conforme indicado pela falta de permeabilização

observada através da coloração PI. A presença de núcleos picnóticos é outro indicador de apoptose (Figura 14, D e E). Esses dados demonstram que tanto o extrato MGD quanto a fração MGA induziram morte celular regulada, muito provavelmente por mecanismos de apoptose.

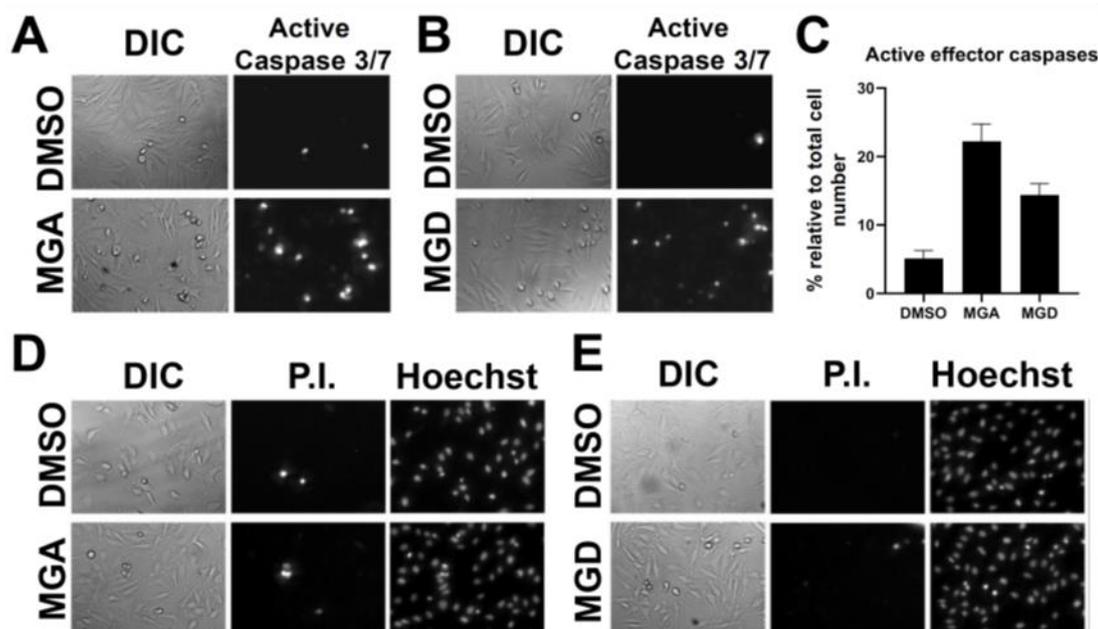


Figura 14: Expressão da ativação das caspases 3/7: MGA e MGD induzem a morte celular por apoptose. Células HeLa tratadas com $2 \times IC_{50}$ de MGA (A) ou MGD (B) foram coradas para caspases 3/7 e caspases ativas foram quantificadas (C). A porcentagem de células apoptóticas (caspase ativa positiva) foi calculada a partir das fotos (A e B) usando microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) como o número total de células. DMSO na mesma concentração foi usado como controle negativo para cada experimento. A morfologia celular foi analisada por DIC. Em seguida, as células foram co-coradas com iodeto de propídio (PI) e Hoechst para análise da permeabilização celular e determinação nuclear, quando tratadas com MGA e MGD respectivamente (D e E). Foram realizados 3 experimentos independentes.

3.2.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS HeLa

O presente estudo investigou, através de citometria de fluxo, se MGD, MGA e Cloridrato de Doxorrubicina, nas doses equivalentes ao IC_{50} , são capazes de afetar o ciclo celular de células HeLa. Os resultados podem ser observados na figura 15 e tabela 2. O controle positivo Cloridrato de Doxorrubicina induziu a parada de ciclo

celular em G2/M, como evidenciado pelo aumento significativo de células na fase G2/M (38,9%) em comparação com o controle negativo (18,05%). MGD e MGA não foram capazes de induzir a parada de ciclo celular nas células HeLa, uma vez que as proporções das células nas fases G1, S e G2/M não diferiram em relação ao grupo controle. No entanto, é possível observar um aumento significativo da quantidade de células em sub-G0 tanto em MGA (16,98%) quanto em MGD (9,33%), quando comparado ao controle negativo (4,15%).

Tabela 2: Proporção de células HeLa em SubG0 e nas fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) após o tratamento com MGD, MGA e Cloridrato de Doxorrubicina em doses equivalentes ao IC₅₀.

	SubG0	G1	S	G2/M
Controle Negativo	4,15 (±0,47)	66,47 (±1,39)	11,1 (±0,57)	18,05 (±1,41)
Cloridrato de Doxorrubicina	12,72 (±2,32)	18,85 (±1,86)	29,03 (±2,62)	38,9 (±2,91)
MGA	16,98 (±2,12)	52,92 (±1,13)	14,02 (±0,39)	15,58 (±1,39)
MGD	9,33 (±1,08)	61,28 (±0,81)	10,06 (±0,33)	18,17 (± 0,82)

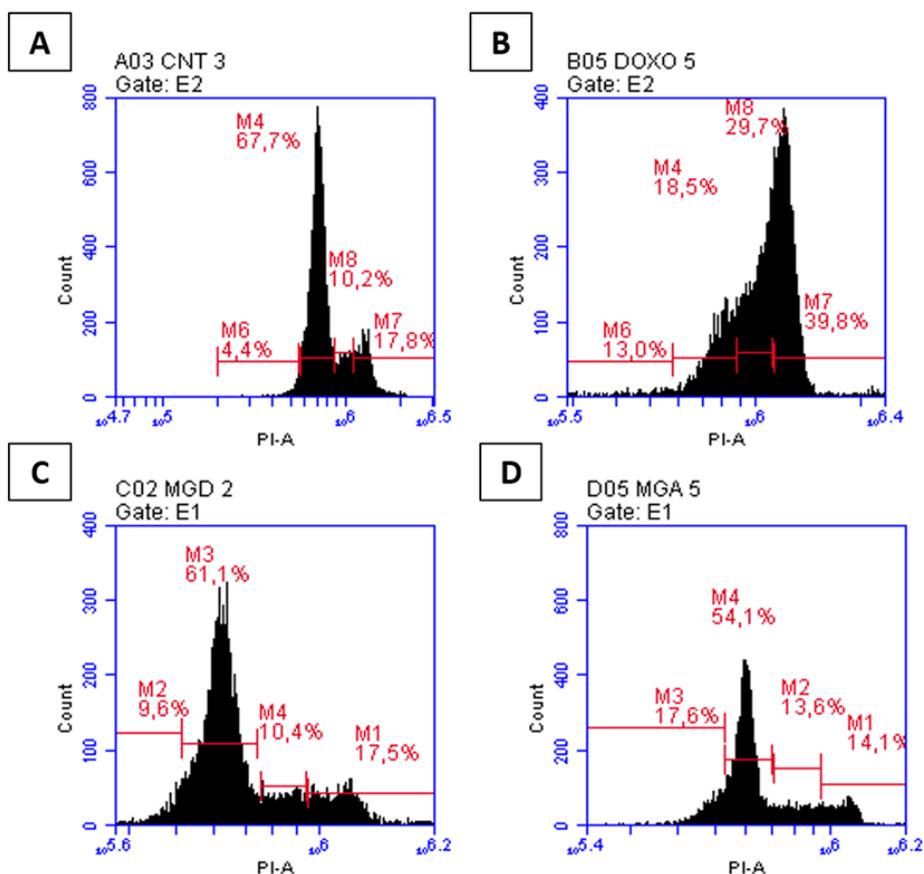


Figura 15: Análise de ciclo celular das células HeLa por citometria de fluxo com PI, após tratamento com: (A) controle negativo, (B) cloridrato de doxorrubicina, (C) MGD e (D) MGA.

3.2.7 DO PERFIL QUÍMICO DAS SUBSTÂNCIAS POR LC-MS

Através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foi possível anotar as substâncias presentes em MGD e MGA. Cromatogramas DAD em 254 nm foram obtidos por LC-MS para ambas as amostras (Figura 16). Foi possível notar que os cromatogramas de MGD (Figura 16, A) e MGA (Figura 16, B) são semelhantes entre si, apresentando picos cromatográficos com o mesmo tempo de retenção, porém com intensidades diferentes. Essa semelhança fica mais evidente ao sobrepor ambos os cromatogramas (Figura 16, C).

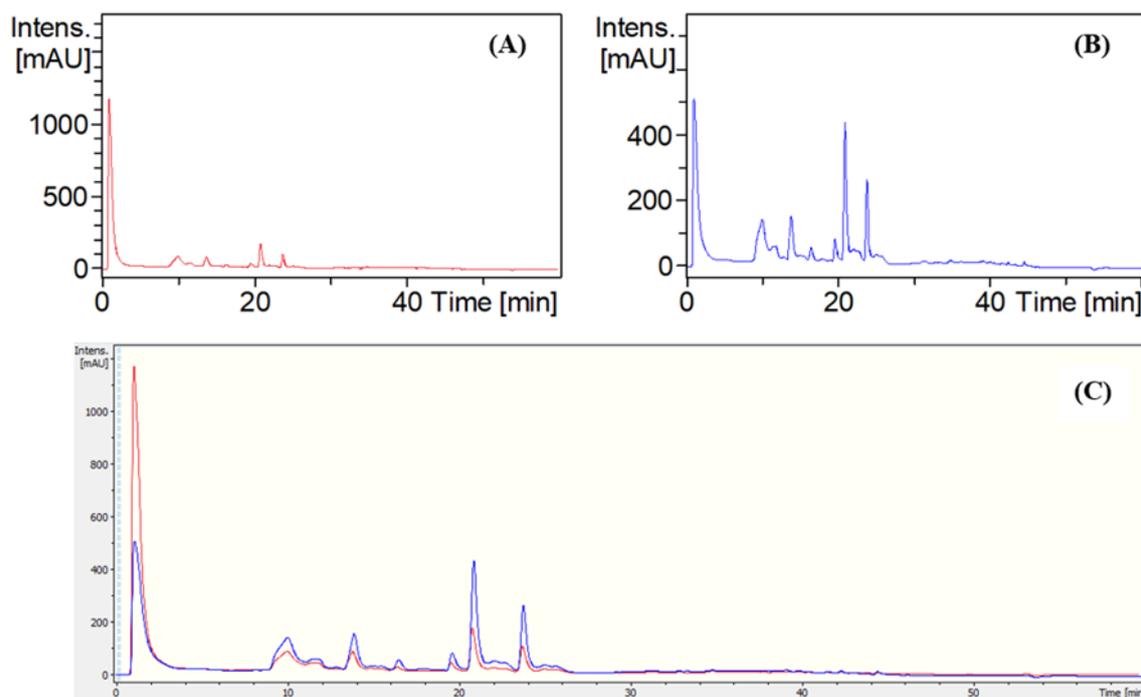


Figura 16: Cromatogramas DAD a 254 nm do extrato MGD (A), da fração MGA (B) por LC-MS. Em (C), sobreposição dos cromatogramas DAD de MGD (linha vermelha) e MGA (linha azul).

Através da técnica de LC-MS foi possível anotar 10 compostos nas amostras MGD e MGA (Tabela 3, Figura 17): ácido quínico (m/z 191,0553), ácido elágico (m/z 300,9993), ácido Tri-O-metil elágico (m/z 343,0427), dois derivados do ácido Tetra-O-metil flavelágico (m/z 359,0382 e m/z 359,0387), quercetrina (m/z 449,1078), ácido Di-O-metil elágico (m/z 331,0462) e três derivados do ácido pentametil coruleoelágico (m/z 405,0818, m/z 405,0823 e m/z 405,0820).

Tabela 3: Caracterização dos compostos anotados por LC-MS no extrato diclorometano (MGD) e fração acetato de etila (MGA) das folhas de *M. glazioviana*

No. Pico	t _R (min.)	m/z [M + H] ⁺	m/z [M - H] ⁻	Fórmula Molecular	MS/MS	Compostos	Referência
1	1.4	-	191.0553	C ₇ H ₁₂ O ₆	127.0384	Ácido Quínico	[PEREIRA <i>et al.</i> , 2019]
2	10.3	-	300.9993	C ₁₄ H ₆ O ₈	284.9957; 257.0093; 229.0126; 201.0214; 173.0254	Ácido Elágico	[ABREU <i>et al.</i> , 2019]
3	12.1	449.1078	-	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	303.0513	Quercetrina	[PILON <i>et al.</i> , 2019]
4	17.1	331.0462	-	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	316.0228; 300.9980; 299.0146; 283.9971; 271.0238; 253.0145; 225.0196	Ácido Di-O-metil elágico	[VIGBEDOR <i>et al.</i> , 2022]
5	19.8	-	343.0427	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	328.0149; 312.9955; 297.9730; 285.004; 269.9769	Ácido Tri-O-metil elágico	[SINGH <i>et al.</i> , 2016]
6	21.2	-	359.0382	C ₁₇ H ₁₂ O ₉	344.0142; 328.9914; 313.9692; 300.9962	Derivado do Ácido Tetra-O-metil flavelágico	[SERAFIN <i>et al.</i> , 2007a]
7	22.5	-	359.0387	C ₁₇ H ₁₂ O ₉	344.0132; 328.9916; 313.9687; 300.9959	Derivado do ácido Tetra-O-metil flavelágico	[SERAFIN <i>et al.</i> , 2007a]
8	24.4	405.0818	-	C ₁₉ H ₁₆ O ₁₀	375.0352; 357.0218; 347.0401; 329.0283	Derivado do Ácido Penta-metil coruleoelágico	[LAKORNWONG <i>et al.</i> , 2018; MUNVERA <i>et al.</i> , 2019]
9	25.3	405.0823	-	C ₁₉ H ₁₆ O ₁₀	375.0334; 357.0219; 347.0373; 329.0262	Derivado do Ácido Penta-metil coruleoelágico	[LAKORNWONG <i>et al.</i> , 2018; MUNVERA <i>et al.</i> , 2019]

10	26.6	405.0820	-	$C_{19}H_{16}O_{10}$	375.0361; 357.0219; 347.0388; 329.0301	Derivado do Ácido Penta- metil coruleoelágico	[LAKORNWONG <i>et al.</i> , 2018; MUNVERA <i>et al.</i> , 2019]
----	------	----------	---	----------------------	---	--	---

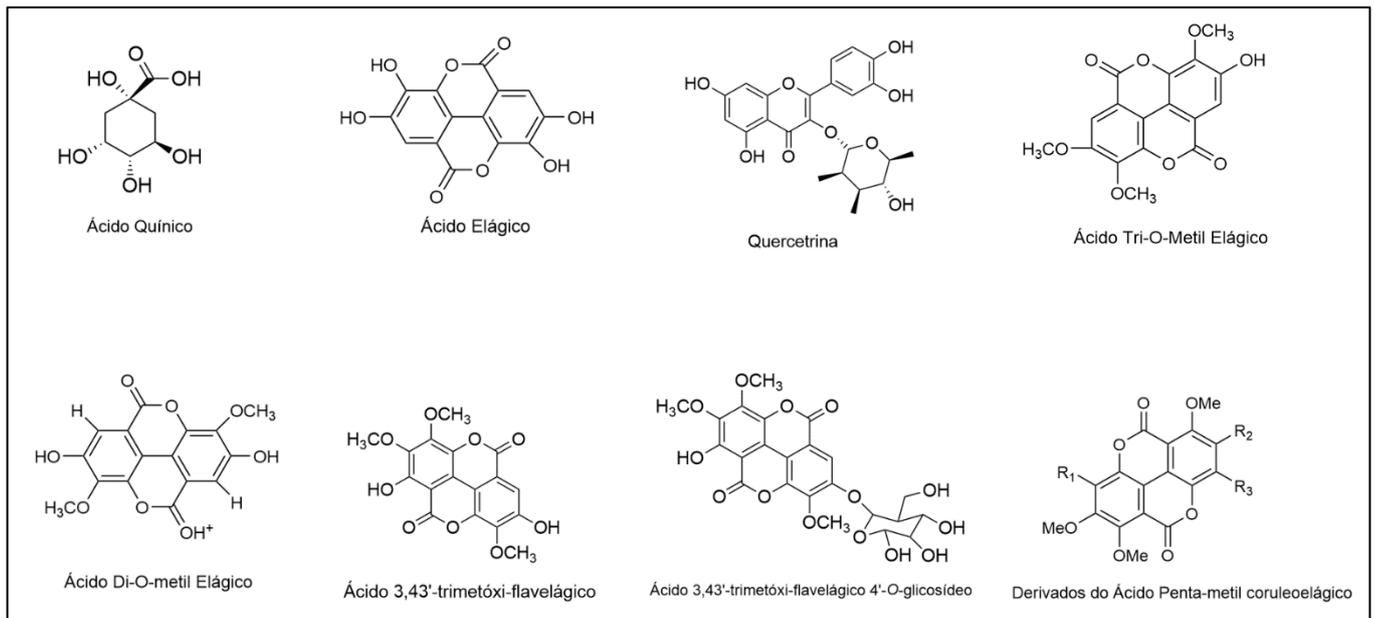


Figura 17: Compostos anotados por LC-MS para MGD e MGA.

3.3 DISCUSSÃO

Através do ensaio de MTT utilizando a linhagem HeLa, notou-se que de todas as amostras testadas, o extrato MGD e a fração MGA apresentaram resultados mais significativos indicando uma possível atividade antiproliferativa frente à esta linhagem celular, uma vez que possuem os menores valores de IC_{50} (Tabela 1). Já o ensaio de MTT em células NIH/3T3, indicou que as amostras interferem na viabilidade celular somente nas concentrações mais altas, refletindo então valores de IC_{50} superiores para essas amostras (Tabela 1). O controle positivo apresentou valores de IC_{50} semelhantes para as duas linhagens celulares.

A partir do cálculo de IC_{50} das amostras frente a HeLa e NIH/3T3, foi possível calcular o IS das amostras, com o objetivo de avaliar se essas amostras são capazes de apresentar atividade antiproliferativa frente a uma linhagem tumoral sem alterar a viabilidade de células normais. Dessa forma, muitos autores determinam que amostras que tenham $IS \geq 2$ podem ser assumidas como seguras para próximos ensaios e tendo um potencial anticâncer, uma vez que são seletivas para linhagens tumorais (RADHA ABBAS HASOON *et al.*, 2021). As amostras MGD e MGA, apresentaram IS de 3,42 e 6,48, respectivamente, portanto, se mostraram seletivas para as células HeLa, mantendo certa segurança em relação aos fibroblastos, uma vez que possuem baixa citotoxicidade frente a esta linhagem. Já o Cloridrato de Doxorrubicina, apesar de ser um fármaco já comercializado e amplamente usado na clínica, possui IS de 1,04, indicando baixa seletividade para HeLa e alta citotoxicidade frente a linhagem NIH/3T3, o que pode explicar os efeitos colaterais observados para esse fármaco.

Ambas as amostras foram capazes de ativar caspases 3/7, sendo essa ativação mais significativa para MGA. Além disso, ao analisar a permeabilidade e

a morfologia celular foi possível notar que as células tratadas com MGD e MGA apresentavam núcleos picnóticos e encolhimento celular com continuidade da integridade da membrana celular. Essas alterações morfológicas somadas a capacidade de ativação das caspases 3/7, sugere que ambas as amostras induzem a morte das células HeLa por processos de apoptose. A apoptose é um processo de morte celular, caracterizada morfológicamente pela condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e perda do potencial transmembranar mitocondrial, que leva a formação de corpos apoptóticos (CARRASCO *et al.*, 2003).

Essas alterações morfológicas são causadas por uma família de proteases chamadas caspases. Dessa forma, as caspases possuem atividade proteolítica e, portanto, são capazes de clivar diversas proteínas, incluindo aquelas que estão envolvidas na manutenção da integridade celular. O processo de morte celular por apoptose tem início quando as caspases são ativadas. Nesse sentido, dez caspases são consideradas como principais e são categorizadas de acordo com sua função no processo de apoptose, são elas: as caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9, 10), caspases efetoras ou executoras (caspases 3, 6, 7) e caspases inflamatórias (caspases 1, 4, 5). Logo, as caspases iniciadoras ativam as caspases efetoras, as quais amplificam o sinal apoptótico causando a ativação de outras caspases e também degradam as proteínas, levando as mudanças morfológicas características da apoptose, como encolhimento celular, fragmentação de DNA e a formação de corpos apoptóticos (CARRASCO *et al.*, 2003; ELMORE, 2007).

Através da citometria de fluxo utilizando PI, foi possível notar que MGD e MGA não induzem a parada de ciclo celular das células HeLa. Mas, há um aumento significativo no número de células em sub-G0, indicando que ambos os extratos induziram a morte das células HeLa. Esse resultado sugere que as células estão

sendo induzidas a apoptose, uma vez que a frequência das células apoptóticas é caracterizada pelo conteúdo de DNA fragmentado, o qual é definido como uma população de células sub-G0/G1 (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2010).

Por fim, o ensaio de migração *in vitro* foi utilizado para avaliar a atividade sobre a migração celular, sendo empregado como uma triagem inicial para avaliação do potencial anti-metastático de uma amostra. No processo metastático há o envolvimento de diferentes etapas, que incluem a migração e invasão das células cancerosas no sistema circulatório e a angiogênese (RAVISHANKAR *et al.*, 2013; NORDIN *et al.*, 2019). As amostras MGD e MGA mostraram-se capazes de inibir a migração de células HeLa após 24 horas de tratamento, indicando um potencial antimigratório e conseqüentemente uma possível atividade anti-metastática, que necessita de diferentes ensaios para ser confirmado. A presença dessas atividades observadas para MGD e MGA pode estar relacionada aos compostos bioativos presentes nas amostras, os quais, em sua grande maioria, pertencem a classe dos metabólicos secundários denominados compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são uma classe de metabólitos secundários vegetais presentes em espécies do gênero *Myrciaria* e com atividades biológicas bem descritas (BORGES *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2022), sua atividade anticâncer se dá através de diversos mecanismos, que incluem por exemplo, efeito inibitório na cascata de sinalização de NF- κ B e da proteína AP-1, efeito antiangiogênico e anti-metastático, além disso os fenólicos podem aprimorar a resposta do sistema imunológico do corpo para reconhecer e destruir as células cancerosas (WAHLE *et al.*, 2010). Os compostos identificados em MGD e MGA apresentaram, em estudos anteriores, atividade antiproliferativa frente a diferentes linhagens tumorais. O ácido elágico, por exemplo, possui atividade antiproliferativa frente as linhagens de

câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, ao regular negativamente a quinase-6 dependente de ciclina (CDK6). A CDK6 é um importante alvo para as drogas quimioterápicas, já que desempenha um papel importante na progressão do câncer. A CDK6 regula o ciclo celular, atuando na transição da fase G1 para fase S durante a divisão celular (YOUSUF *et al.*, 2020). O ácido elágico também apresentou atividade antiproliferativa frente as linhagens de câncer pancreático PANC-1, AsPC-1 e MIA PaCA-2, induzindo a ativação das caspases 3/9 (KIM *et al.*, 2021). Já a quercetrina, metabólito secundário identificado em MGD e MGA, possui atividade antiproliferativa contra células de câncer colorretal humano SW620, ao induzir a morte de tais células através de mecanismos como apoptose e parada do ciclo celular nas fases G2/M. Dessa forma, a quercetrina induz a superexpressão das proteínas p53 e p21, Bax, Citocromo C e Caspases 3/9 (ZHANG *et al.*, 2017).

A atividade antiproliferativa observada para MGD e MGA frente as células HeLa parecem ter relação direta com a capacidade dessas amostras em induzir a morte celular por apoptose. Nesse sentido, diversos estudos apontam a capacidade dos ácidos fenólicos de promover a apoptose via aumento de caspases efetoras 3 e 7, como por exemplo os ácidos vanílico, síringico, cafeico e ferrúlico (ABOTALEB *et al.*, 2020). Os metabólitos secundários identificados em MGD e MGA também são capazes de induzir a ativação da caspase 3, induzindo a apoptose de diferentes linhagens celulares. Nesse sentido, o ácido elágico induz a apoptose de células de câncer cervical SiHa (CHEN *et al.*, 2020) e de células de câncer de pâncreas (KIM *et al.*, 2021) e a quercetrina induz a apoptose em uma linhagem de câncer colorretal (ZHANG *et al.*, 2017). Portanto, o resultado observado para MGD e MGA, que

induzem a apoptose de células HeLa via caspases 3 e 7, pode estar relacionado a presença de compostos fenólicos nessas amostras.

As mortes por câncer, em parte, estão relacionadas ao aparecimento de metástases. Dessa forma, um dos principais objetivos da terapia do câncer é prevenir o processo metastático e a formação de tumores secundários. O processo de metástase pode ser dividido em diferentes etapas, que incluem a migração e invasão das células cancerosas no sistema circulatório e a angiogênese (INCA, 2023). Estudos apontam que os compostos fenólicos são capazes de inibir o processo de angiogênese, além de reduzir a capacidade de adesão e invasão das células cancerosas, impedindo então a metástase (WAHLE *et al.*, 2010). O ácido elágico apresentou efeito antimigratório em modelo *in vitro* de migração celular utilizando as linhagens de melanoma WM115 e A375. Estudo sugere que essa inibição da migração ocorre através da via de sinalização do EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico tirosina quinase). EGFR é ativado em processos tumorigênicos e participa de processos de metástase, uma vez que a sua superexpressão está relacionada ao aumento da adesão das células tumorais à matriz extracelular (WANG *et al.*, 2020). A presença de compostos fenólicos em espécies do gênero *Myrciaria*, pode então justificar a atividade antimigratória observada para as amostras MGA e MGD, através do ensaio de migração celular *in vitro*. Foi possível notar uma atividade antiproliferativa mais significativa para a fração MGA do que para o extrato MGD. Apesar de terem sido anotados os mesmos compostos para ambas as amostras, foi possível notar que os picos cromatográficos para MGA possuem uma intensidade maior, indicando uma possível concentração maior dos compostos fenólicos. Esse fato pode explicar a diferença de atividade observada para as amostras

4. CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO EXTRATO DICLOROMETANO DE *M. glazioviana*

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS FOLHAS DE *M. glazioviana*

Visando a obtenção de uma maior quantidade de extrato diclorometano para isolamento dos compostos, foi realizada uma nova coleta e extração. As folhas de *M. glazioviana* (1,286 kg) foram coletadas em seu habitat natural em Nova Friburgo – Rio de Janeiro, Brasil (22°17'02.6"S 42°31'29.9"W), mesmo local onde foi realizada a coleta anterior. Esta segunda coleta foi realizada no dia 23 de abril de 2021, sob as seguintes condições meteorológicas: temperatura média (17,5°C), precipitação (0,0mm), umidade relativa mínima (41%) e umidade relativa máxima (90%) (AGRITEMPO,2023).

Em seguida, as folhas foram lavadas com solução de hipoclorito 2%, estabilizadas e secas em estufas de ar circulante à temperatura de 40°C e pulverizadas, dando origem à 291,35g de pó seco. Essa amostra foi submetida ao processo de maceração exaustiva com diferentes solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) na proporção pó/solvente de 1:5 (massa/volume), seguindo a série eluotrópica da menor para maior polaridade. A extração foi repetida três vezes para cada solvente. Os solventes foram removidos com auxílio de um rotaevaporador, obtendo diferentes extratos: hexano (10,15g), diclorometano (6,25g), acetato de etila (3,13g), etanol 95% (8g). O novo extrato diclorometano das folhas de *M. glazioviana* (MGD2) foi destinado ao isolamento dos compostos bioativos.

4.1.2 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS DE *M. glazioviana*

Os compostos bioativos do extrato diclorometano das folhas de *M. glazioviana* foram isolados através de técnicas de fitoquímica clássica. Após análise do extrato por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), o extrato MGD2 (6,25g) foi submetido a Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV), visando a purificação da amostra. Foi utilizado sílica gel como fase estacionária e os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol como fase móvel, puros ou em diferentes combinações em grau crescente de polaridade (Tabela 4). A partir da CLV, foram obtidas 20 diferentes frações da amostra MGD2, dentre as quais, 3 destas frações apresentaram a formação de precipitados e por isso foram submetidas a duas diferentes técnicas visando o isolamento dos compostos: centrifugações sucessivas (10min/3300 rpm) com acetona e a técnica de CCD. A técnica de CCD foi realizada utilizando placa de sílica gel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 (Macherey-Nagel Co., Düren, Alemanha) e o sistema de solvente clorofórmio:acetato de etila (8:2).

Tabela 4: Solventes utilizados e frações obtidas a partir da técnica de Cromatografia Líquida à Vácuo (CLV).

Frações	Solventes Utilizados	Peso das Frações
1	Hexano (100%)	0,20g
2	Hexano (100%)	0,02g
3	Hexano (100%)	0,03g
4	Hexano: Diclorometano (1:1)	0,01g
5	Hexano: Diclorometano (1:1)	0,43g
6	Diclorometano (100%)	0,08g

7	Diclorometano (100%)	0,42g
8	Diclorometano (100%)	0,66g
9	Diclorometano: Acetato de Etila (8:2)	0,26g
10	Diclorometano: Acetato de Etila (8:2)	1,26g
11	Diclorometano: Acetato de Etila (8:2)	0,57g
12	Diclorometano: Acetato de Etila (7:3)	0,03g
13	Diclorometano: Acetato de Etila (7:3)	0,14g
14	Diclorometano: Acetato de Etila (7:3)	0,03g
15	Acetato de Etila (100%)	0,32g
16	Acetato de Etila (100%)	0,34g
17	Acetato de Etila (100%)	0,03g
18	Metanol: Acetato de Etila (1:1)	0,16g
19	Metanol: Acetato de Etila (1:1)	0,54g
20	Metanol (100%)	0,16g

4.1.3 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO DICLOROMETANO POR LC-MS IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

O extrato diclorometano das folhas de *M. glazioviana* (MGD2) foram anotados por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS) e seus compostos isolados foram identificados e caracterizados através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C . Os espectros de RMN foram obtidos em um

VARIAN-NMR-SYSTEM 500 MHz, operando a 500 MHz para RMN ^1H e 125 MHz para RMN ^{13}C . As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em clorofórmio e DMSO deuterados (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. O extrato MGD2 foi submetido a técnica de LC-MS para identificação de compostos, seguindo o protocolo descrito no capítulo anterior.

4.1.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DOS COMPOSTOS ISOLADOS E DE SEU EXTRATO DE ORIGEM

4.1.4.1 ENSAIO DA ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT COM CÉLULAS HeLa E CÉLULAS NIH/3T3

Para determinar a viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de atividade metabólica colorimétrica de MTT, utilizando duas linhagens celulares: a linhagem de fibroblasto murino NIH/3T3 e a linhagem de câncer cervical humano HeLa. Foram testados os compostos isolados e seu extrato de origem (MGD2). A metodologia utilizada foi idêntica a descrita anteriormente no Capítulo 1.

4.1.4.2 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O Índice de Seletividade dos compostos isolados e de seu extrato de origem (MGD2) foram calculados utilizando o mesmo método citado anteriormente no Capítulo 1. Amostras com $\text{IS} \geq 2$ podem ser assumidas como sendo seletivas e com um potencial anticâncer e, portanto, aptas para estudos posteriores (RADHA ABBAS HASOON *et al.*, 2021).

4.1.4.3 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS HeLa

A citometria de fluxo foi realizada visando a análise do ciclo celular das células HeLa, quando tratadas com os compostos isolados e o extrato MGD2 nos valores referentes ao IC₅₀. A metodologia realizada foi idêntica a citada no capítulo anterior.

4.1.5 PREDIÇÃO *in silico* DE ALVOS MOLECULARES (TARGET FISHING)

Visando a investigação de possíveis alvos farmacológicos das substâncias isoladas de MGD2, foi utilizada uma abordagem mista baseada em ligante e estrutura. Foi utilizado o servidor web Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), que se baseia no princípio da similaridade química e amplamente utilizado para identificar compostos com bioatividades semelhantes baseado na similaridade estrutural entre dois ou mais ligantes. A informação do composto alvo é comparada com milhares de ligantes e de proteínas diferentes e uma probabilidade é atribuída à interação. As estruturas dos compostos foram desenhadas no software Avogadro (<https://avogadro.cc/>) e convertidas no formato. smiles no software Open Babel.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO DICLOROMETANO POR LC-MS, ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

O extrato MGD2 foi submetido à análise do seu perfil fitoquímico através da técnica de LC-MS. A partir dessa análise foi possível notar que o perfil fitoquímico de MGD2 é muito semelhante às amostras utilizadas no primeiro capítulo deste trabalho (MGD e MGA), uma vez que dos 10 compostos identificados anteriormente, somente 3 estão ausentes em MGD2.

Ao analisar os cromatogramas DAD a 254nm das amostras MGD e MGD2 foi possível observar que em MGD2 há uma ausência dos compostos: ácido quínico (t_R : 1,4 min), ácido elágico (t_R : 10,3 min) e quercetrina (t_R : 12,1 min). Dessa forma, estão presentes na amostra MGD2: ácido di-O-metil elágico (t_R : 17,2 min), ácido tri-O-metil elágico (t_R : 19,8 min), dois derivados do ácido tetra-O-metil flavelágico (t_R : 21,2 min e 22,5 min) e três derivados do ácido penta-metil coruleoelágico (t_R : 24,4; 25,3 e 26,6 min) (Figura 18).

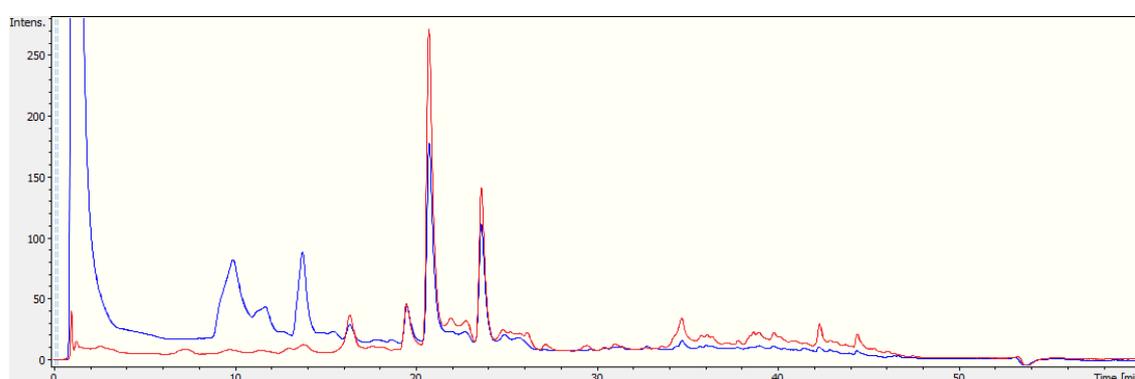


Figura 18: Sobreposição dos cromatogramas DAD a 254 nm de MGD2 (linha vermelha) e MGD (linha azul) obtidos por HPLC-DAD-qTOF.

Em seguida o extrato MGD2 foi submetido a CLV, resultando em diferentes frações. A fração MGD2-10 (1,26g) foi submetida a centrifugações sucessivas (10min/3300 rpm) com acetona, possibilitando a separação de um precipitado amarelo e um sobrenadante laranja. Ambos foram analisados por CCD, indicando que houve a separação de 2 compostos distintos identificados como o composto 1 (78,5mg) e o composto 2 (34mg), respectivamente.

O composto 1 foi isolado na forma de um sólido amorfo de cor alaranjada. Sua fórmula molecular foi determinada por EMAR-IES que mostrou o pico do íon $[M+Na]^+$ com m/z 427,0645 (calcd. para $C_{19}H_{17}O_{10}Na$, 427,0645) compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{16}O_{10}$.

No espectro de RMN de ^1H a 500 MHz em DMSO- d_6 foi possível observar a presença de um hidrogênio quelado em δ_{H} 10,32 (s, 1H) e 4 sinais como singlete em δ_{H} 4,14 (s, 6H), 3,96 (s, 3H), 3,92 (s, 3H) e 3,91 (s, 3H) indicando a presença de cinco grupos metóxi presente na substância (Figura 19).

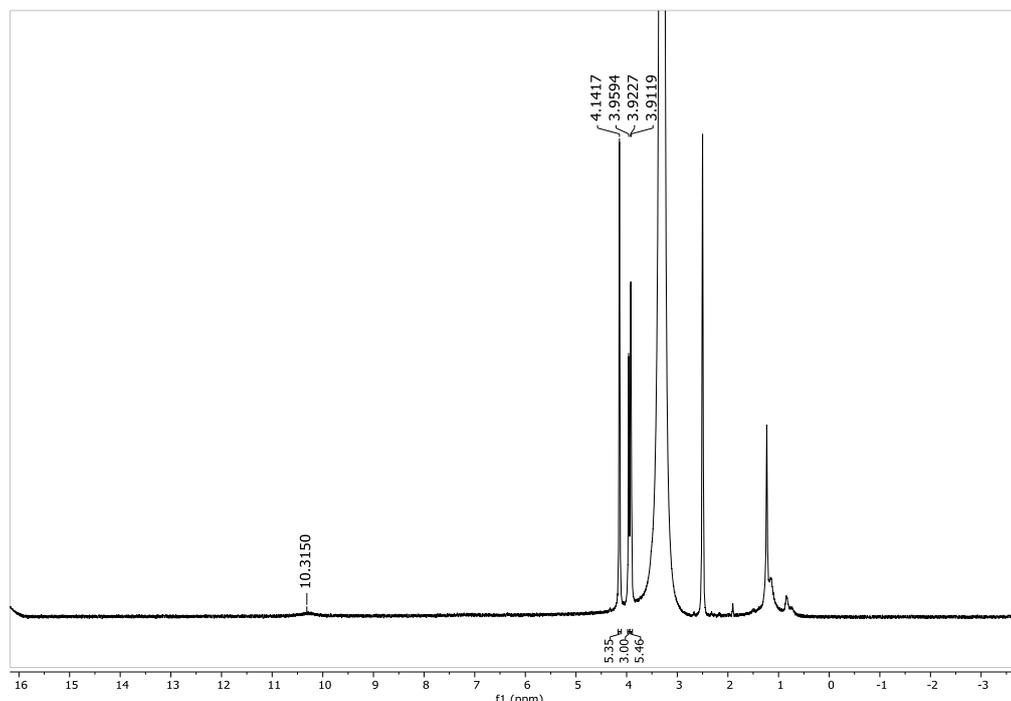


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H do composto 1 em DMSO- d_6 .

O espectro de RMN de ^{13}C BB 125 MHz em DMSO- d_6 foi possível observar a presença de dezenove sinais de carbonos, sendo assinalados 5 sinais a cinco grupos metóxi (δ_{C} 61,9 (5'-OCH $_3$), 61,7 (3'-OCH $_3$), 61,7 (3-OCH $_3$), 61,6 (4'-OCH $_3$) e 61,1 (4-OCH $_3$)), 12 sinais a carbonos aromáticos hexasubstituídos (δ_{C} 111,9 (C-1), 134,3 (C-2), 146,7 (C-3), 141,4 (C-4), 151,4 (C-5), 97,9 (C-6), 114,3 (C-1'), 137,1 (C-2'), 148,0 (C-3'), 146,3 (C-4'), 152,8 (C-5') e 106,5 (C-6')) e 2 sinais a carbonos de lactônons (δ_{C} 154,7 (C-7') e 161,0 (C-7)) (Figura 20). A comparação desses resultados com os dados da literatura levou a identificação da substância como um derivado do ácido coruleoelágico, o ácido 3,3',4,4',5'-penta-metil coruleoelágico (LAKORNWONG *et al.*, 2018).

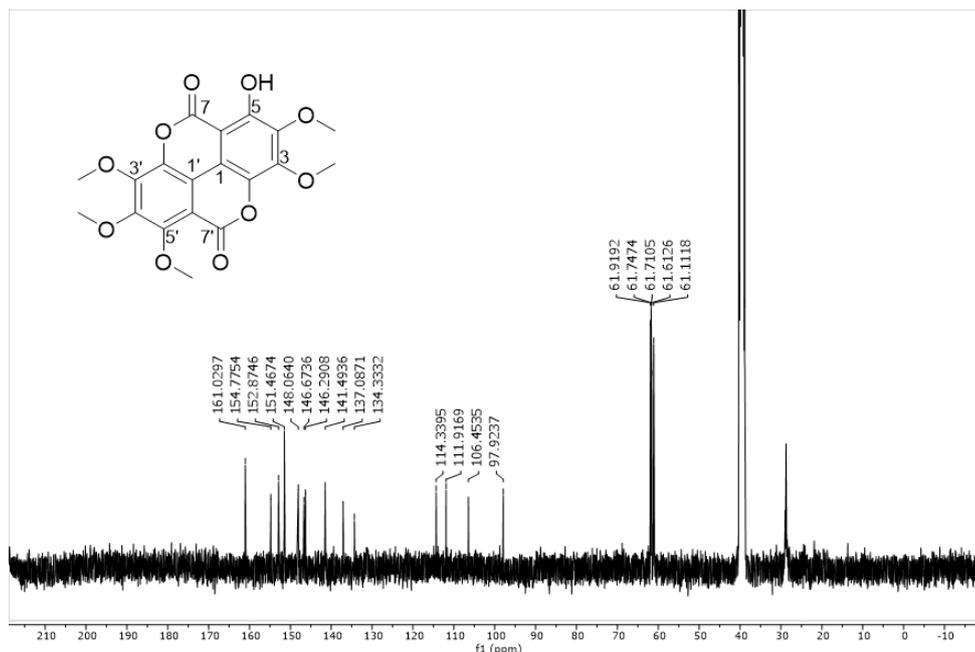


Figura 20: Espectro de RMN de ¹³C do composto 1 em DMSO-d₆.

O composto 2 foi isolado na forma de um sólido amorfo de cor amarelo fluorescente. Sua fórmula molecular foi determinada por EMAR-IES que mostrou o pico do íon [M+Na]⁺ com *m/z* 427,0645 (calcd. para C₁₉H₁₇O₁₀, Na 427,0645) compatível com a fórmula molecular C₁₉H₁₆O₁₀.

No espectro de RMN de ¹H a 500 MHz em DMSO-d₆ foi possível observar a presença de 4 sinais como singlete em δ_H 4,14 (s, 6H), 3,96 (s, 3H), 3,92 (s, 3H) e 3,90 (s, 3H) indicando a presença de cinco grupos metóxi presente na substância. O espectro de ¹H de RMN do composto 2 mostrou-se bastante semelhante ao do composto 1, tendo como principal diferença a ausência do hidrogênio quelado, indicando que a hidroxila não está presente em C-5. Outra observação é a leve diferença de deslocamento químico das metoxilas como pode ser visto na Figura 21.

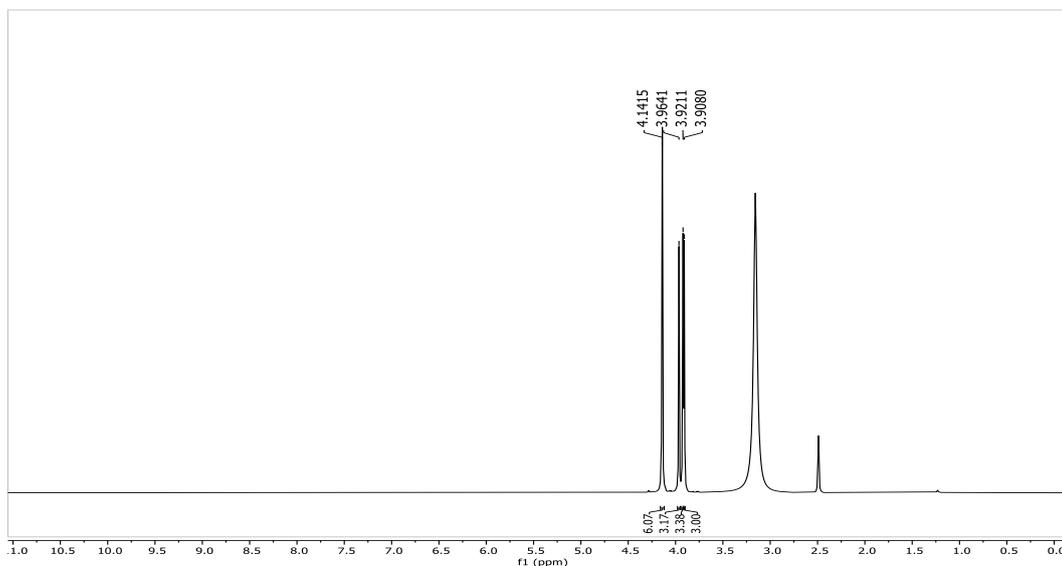
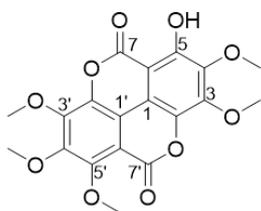


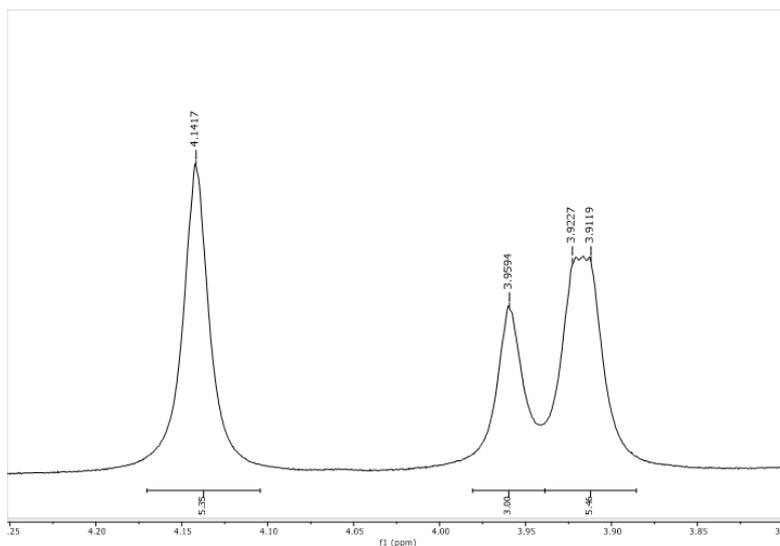
Figura 21: Espectro de RMN de ^1H do composto 2 em DMSO- d_6 .

Ao fazer o levantamento sobre as possíveis variações da posição da hidroxila, percebeu-se que ela pode além de estar presente em C-5, como no composto 1, pode estar presente em C-4 e C-3, sendo a última relatada por Munvera e colaboradores em 2019 (MUNVERA, *et al.*, 2019). Comparando os espectros de RMN de ^1H do composto 1, com a hidroxila em C-5, e do composto relatado por Munvera e colaboradores, com a hidroxila em C-3, percebe-se que o composto 2 se trata de um composto diferente e esses dados indicam que o composto 2 possui a presença da hidroxila em C-4 (Figura 22).

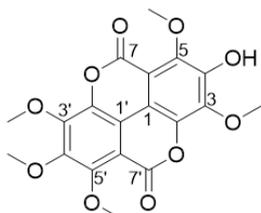
ácido 3,3',4,4',5'-penta-
metil coruleoelágico



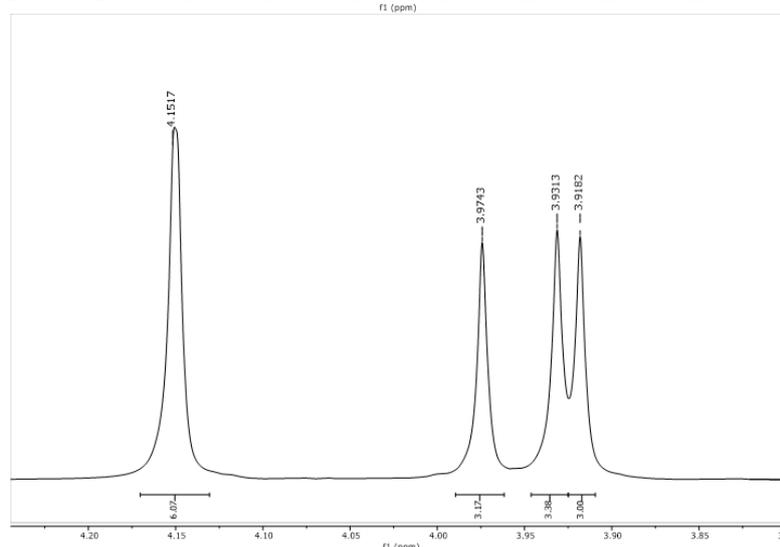
Composto 1



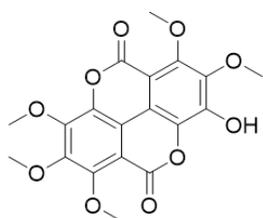
ácido 3,3',4,5,5'-penta-
metil coruleoelágico



Composto 2



ácido 3,4,4',5,5'-penta-
metil coruleoelágico



(MUNVERA, et al., 2019)

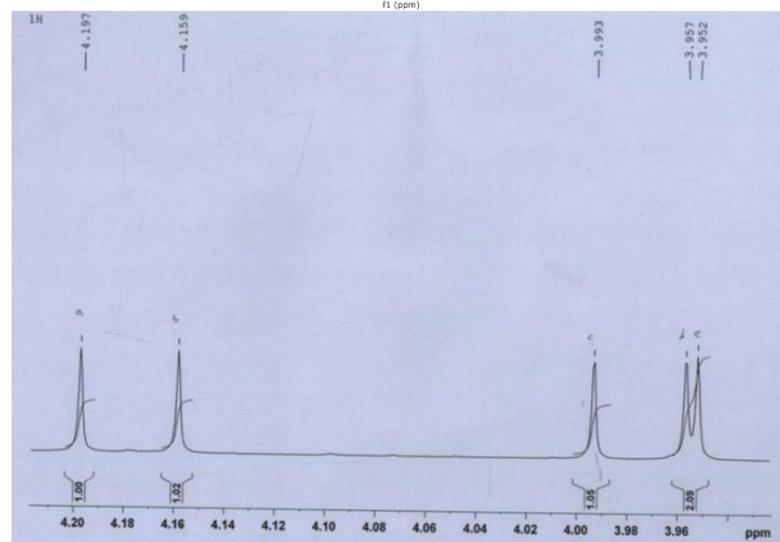


Figura 22: Espectro de RMN de ^1H dos compostos 1, 2 e do ácido 3,4,4',5,5'-penta-metil coruleoelágico (MUNVERA, *et al.*, 2019) em DMSO- d_6 .

O espectro de RMN de ^{13}C BB 125 MHz em DMSO-d6 foi possível observar a presença de dezenove sinais de carbonos, sendo assinalados 5 sinais a cinco grupos metóxi (δ_{C} 61,7 (5'-OCH₃), 61,4 (3'-OCH₃), 61,5 (3 e 5-OCH₃), 60,9 (4'-OCH₃)), 12 sinais a carbonos aromáticos hexasubstituídos (δ_{C} 111,7 (C-1), 134,1 (C-2), 146,5 (C-3), 141,3 (C-4), 151,4 (C-5), 97,7 (C-6), 114,2 (C-1'), 136,9 (C-2'), 147,9 (C-3'), 146,1 (C-4'), 152,7 (C-5') e 106,3 (C-6')) e 2 sinais a carbonos de lactônons (δ_{C} 154,5 (C-7') e 160,8 (C-7)) (Figura 23). A confirmação da posição dos grupos metóxi nos compostos já relatados foram feitas a partir de correlações cruzadas observadas no espectro de NOESY entre elas. Essa correlação não foi observada no composto 2, indicando que os grupos metóxi presentes em C-5 e C-3 por possuírem uma distância maior, não correlacionariam. A comparação desses resultados com os dados da literatura, levaram a identificação da substância como um novo derivado do ácido coruleoelágico, o ácido 3,3',4',5,5'-penta-metil coruleoelágico (LAKORNWONG *et al.*, 2018; MUNVERA, *et al.*, 2019).

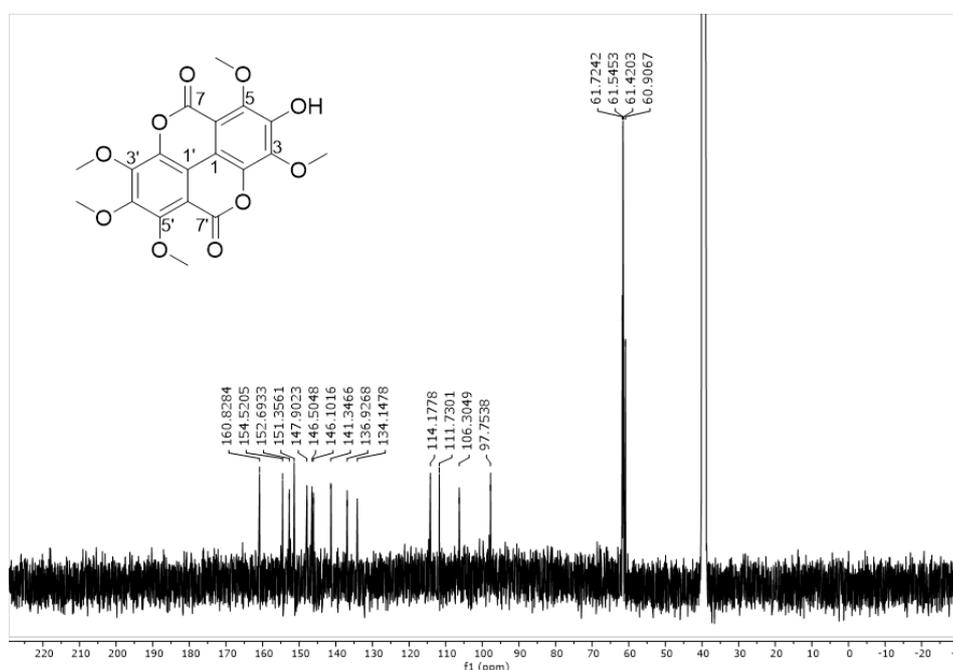


Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2 em DMSO-d6.

4.2.2 ENSAIO DA ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT EM CÉLULAS HeLa

Através do ensaio de atividade metabólica colorimétrica de MTT realizada com as células HeLa, pode-se determinar a viabilidade celular bem como o IC₅₀ do extrato MGD2 e seus compostos isolados.

O extrato MGD2 apresentou diferença estatística quando comparado ao controle negativo em todas as concentrações, exceto em sua concentração mais baixa (3,90 µg/mL), apresentando viabilidade celular de 89,62%. Na concentração mais baixa, 7,81µg/mL a porcentagem de células viáveis foi de 77,75%. Já na concentração mais alta, 250 µg/mL, a viabilidade celular foi de 4,44%. O IC₅₀ dessa amostra foi 29,82 µg/mL (Figura 24).

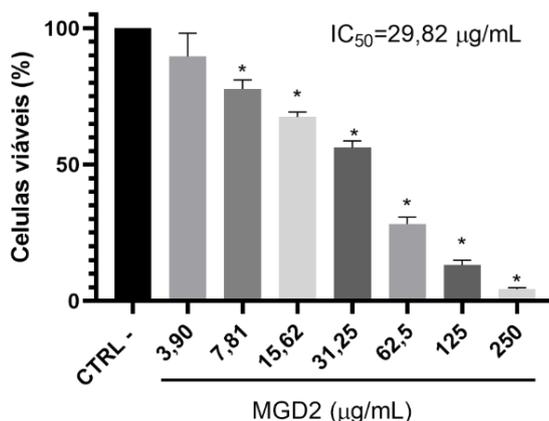


Figura 24: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de câncer cervical (HeLa) após o tratamento com o extrato diclorometânico das folhas de *M. glazioviana* (MGD2). Dados apresentados como média ± SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, *p < 0,05 considerado significativo.

O composto isolado 1, apresentou diferença estatística quando comparado com o veículo, em todas as concentrações testadas, com exceção da concentração de 0,7µg/mL, onde a porcentagem de células viáveis foi de 83,65%. Na concentração de 1,4 µg/mL a viabilidade celular foi de 55,87% e na concentração

de 22,5 µg/mL, a porcentagem de células viáveis foi de 17,29% (Figura 25). O IC₅₀ dessa amostra foi de 3,77 µg/mL.

O composto isolado 2 apresentou diferença estatística quando comparado com o veículo em todas as concentrações testadas (Figura 25). Na menor concentração, 0,7 µg/mL, a porcentagem de células viáveis foi de 64,73, enquanto que na concentração mais alta, 22,5 µg/mL, a viabilidade celular foi de 15,49%. O IC₅₀ dessa amostra foi de 2,89 µg/mL.

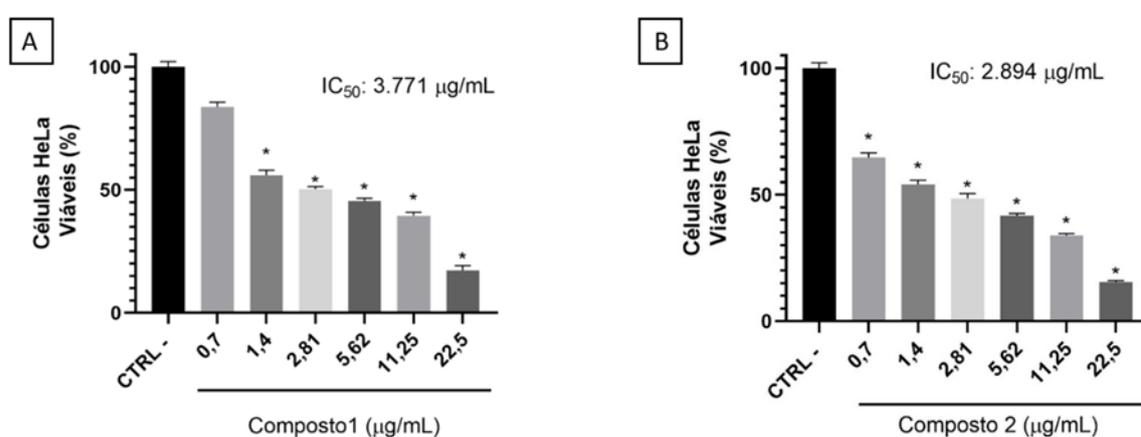


Figura 25: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de câncer cervical (HeLa) após o tratamento com o Composto Isolado 1 (A) e Composto Isolado 2 (B). Dados apresentados como média ± SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, *p < 0,05 considerado significativo.

Ao realizar o ensaio de MTT, tratando as células HeLa com DMSO (Figura 26), nas concentrações equivalentes em que a substância é utilizada para diluir os compostos isolados, é possível perceber que o DMSO foi incapaz de afetar a viabilidade celular de maneira significativa, apresentando diferença estatística quando comparado ao veículo somente nas concentrações mais altas. Em tais concentrações (7,2 e 14,4 µg/mL), a viabilidade celular observada foi de 69,32% e 58,35%, respectivamente. Uma vez que em todas as concentrações a viabilidade celular manteve-se superior a 50% das células, não foi possível determinar o valor de IC₅₀ dessa amostra. Na figura 26 também é possível observar a viabilidade

celular após o tratamento com o controle positivo, Cloridrato de Doxorrubicina. Como citado no capítulo anterior, o IC_{50} dessa amostra foi de 1,33 $\mu\text{g/mL}$.

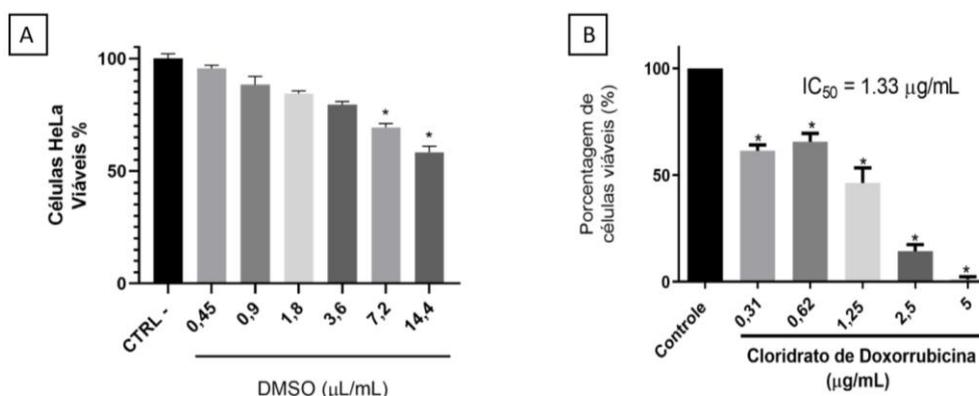


Figura 26: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de câncer cervical (HeLa) após o tratamento com Dimetilsulfóxido – DMSO (A) e Cloridrato de Doxorrubicina (B). Dados apresentados como média \pm SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, * $p < 0,05$ considerado significativo.

4.2.3 ENSAIO A ATIVIDADE METABÓLICA COLORIMÉTRICA DE MTT EM CÉLULAS NIH/3T3

A viabilidade celular da linhagem de fibroblasto NIH/3T3 foi analisada diante do tratamento com o extrato MGD2, os compostos isolados 1 e 2, o Cloridrato de Doxorrubicina e o DMSO. O extrato MGD2 foi testado em diferentes concentrações, apresentando diferença estatística somente nas maiores concentrações (250 e 125 $\mu\text{g/mL}$), com a porcentagem de células viáveis de 22,40% e 57,47%, respectivamente. A amostra MGD2 apresentou IC_{50} de 124,9 $\mu\text{g/mL}$ para essa linhagem celular (Figura 27).

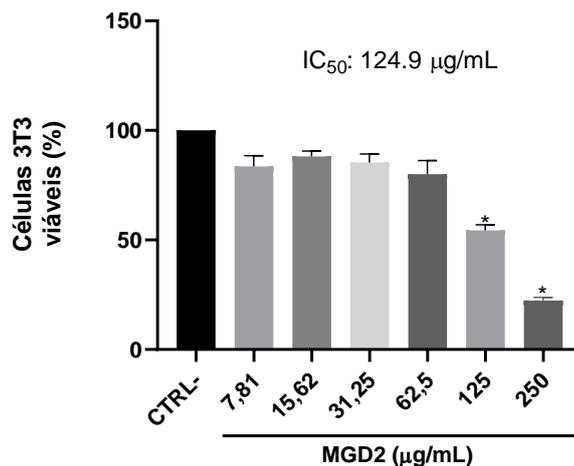


Figura 27: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de fibroblasto (NIH/3T3) após o tratamento com o extrato MGD2. Dados apresentados como média \pm SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, * $p < 0,05$ considerado significativo.

O composto 1 foi testado através do ensaio de MTT com células NIH/3T3. Foi observado diferença estatística quando comparado ao controle negativo na concentração de 11,25 e 22,5 $\mu\text{g/mL}$, com viabilidade celular de 58,09% e 40,38%, respectivamente. O composto 1 apresentou IC_{50} de 9,12 $\mu\text{g/mL}$ para essa linhagem celular (Figura 28).

O composto 2 apresentou um perfil semelhante ao observado para o composto 1 no ensaio de MTT com células NIH/3T3. Foi observado diferença estatística nas maiores concentrações (11,25 e 22,5 $\mu\text{g/mL}$), com viabilidade celular de 57,47% e 43,21%, respectivamente. O composto 2 apresentou IC_{50} de 8,94 $\mu\text{g/mL}$ para essa linhagem celular (Figura 28).

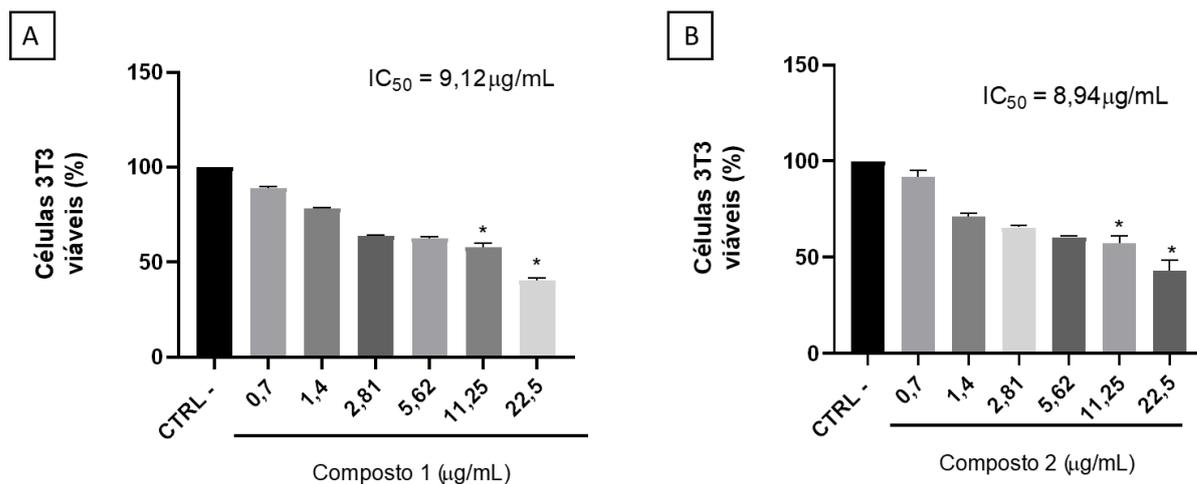


Figura 28: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de fibroblasto (NIH/3T3) após o tratamento com o Composto Isolado 1 (A) e Composto Isolado 2 (B). Dados apresentados como média \pm SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, * $p < 0,05$ considerado significativo.

O controle positivo Cloridrato de Doxorrubicina apresentou IC₅₀ de 1,39 µg/mL, como apresentado no capítulo 1 (Figura 29). Ao realizar o ensaio de MTT, tratando as células NIH/3T3 com DMSO, nas concentrações equivalentes em que a substância é utilizada para diluir os compostos isolados, é possível perceber que o DMSO foi incapaz de afetar a viabilidade celular de maneira significativa. Não foi possível determinar o valor de IC₅₀ dessa amostra, uma vez que em todas as concentrações a viabilidade celular manteve-se superior a 50% das células. (Figura 29).

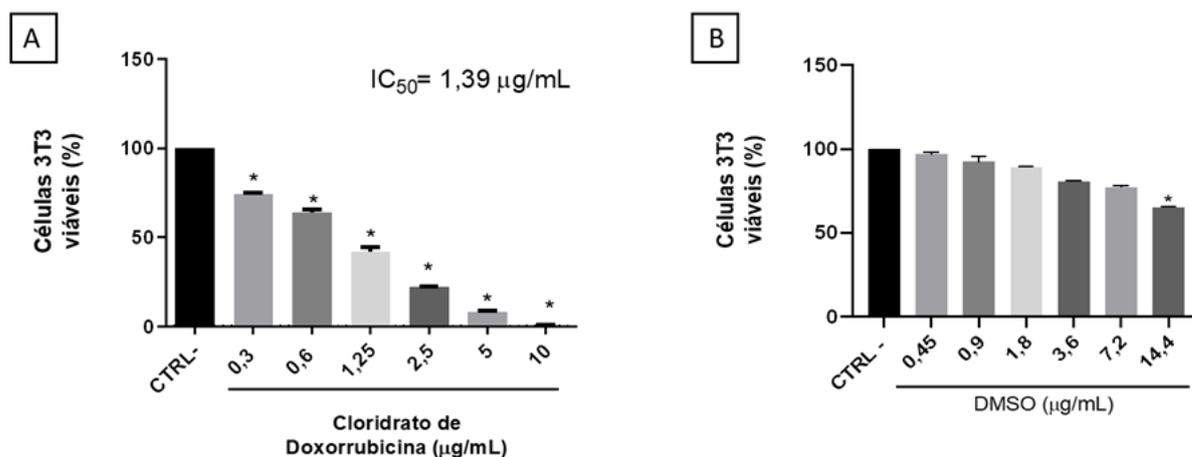


Figura 29: Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de fibroblasto (NIH/3T3) após o tratamento com o controle positivo Cloridrato de Doxorribicina (A) e DMSO (B). Dados apresentados como média \pm SEM. One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet, foi utilizado para analisar a diferença entre o controle e os grupos de tratamento, * $p < 0,05$ considerado significativo.

4.2.4 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE

A partir dos valores de IC₅₀ obtidos pelo ensaio de atividade colorimétrica de MTT em células HeLa e NIH/3T3 foi possível calcular os valores de Índice de Seletividade para as amostras MGD, MGA e Cloridrato de Doxorribicina (Tabela 5).

Tabela 5: Valores de IC₅₀ com as linhagens celulares HeLa e NIH/3T3 e de Índice de Seletividade (IS) das amostras MGD2, Composto 1, Composto 2 e Cloridrato de Doxorribicina

Amostra	IC ₅₀ – HeLa (µg/mL)	IC ₅₀ – NIH/3T3 (µg/mL)	Índice de Seletividade (IS)
MGD2	29,82	124,9	4,18
Composto 1	3,77	9,12	2,41
Composto 2	2,89	8,94	3,09
Cloridrato de Doxorribicina	1,33	1,39	1,04

4.2.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS HeLa

Através de citometria de fluxo de células HeLa tratadas com MGD2, composto 1 e composto 2 foi possível notar um aumento da quantidade de células em sub-G0 para as três amostras quando comparadas ao controle negativo. O controle negativo apresentou 4,15% das células em sub-G0, enquanto que em MGD2 esse percentual foi de 12,48% e nos compostos isolados 1 e 2 esses valores foram de 12,53 e 8,96%, respectivamente (Tabela 6).

Também foi possível notar que ambos os compostos isolados, nas doses equivalentes ao IC₅₀, são capazes de afetar o ciclo celular de células HeLa. Os resultados podem ser observados na figura 30 e tabela 6. O composto 1 induziu a parada de ciclo celular em G2/M, como evidenciado pelo aumento significativo de células na fase G2/M (25,22%) em comparação com o controle negativo (18,05%). O composto 2 também induziu a parada do ciclo celular em G2/M, quando comparado com o controle negativo, porém de forma menos intensa (21,4%).

Tabela 6: Proporção de células HeLa em SubG0 e nas fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) após o tratamento com MGD2, Composto 1 e Composto 2 em doses equivalentes ao IC₅₀.

	SubG0	G1	S	G2/M
Controle Negativo	4,15 (±0,47)	66,47 (±1,39)	11,1 (±0,57)	18,05 (±1,41)
MGD2	12,48 (±2,20)	60,35 (±1,05)	12,63 (±0,79)	15,97 (±1,93)
Composto 1	12,53 (±1,04)	50,63 (±1,53)	12,82 (±0,69)	25,22 (±0,42)
Composto 2	8,96 (±1,10)	60,47 (±1,25)	11,03 (±0,50)	21,40 (±1,37)

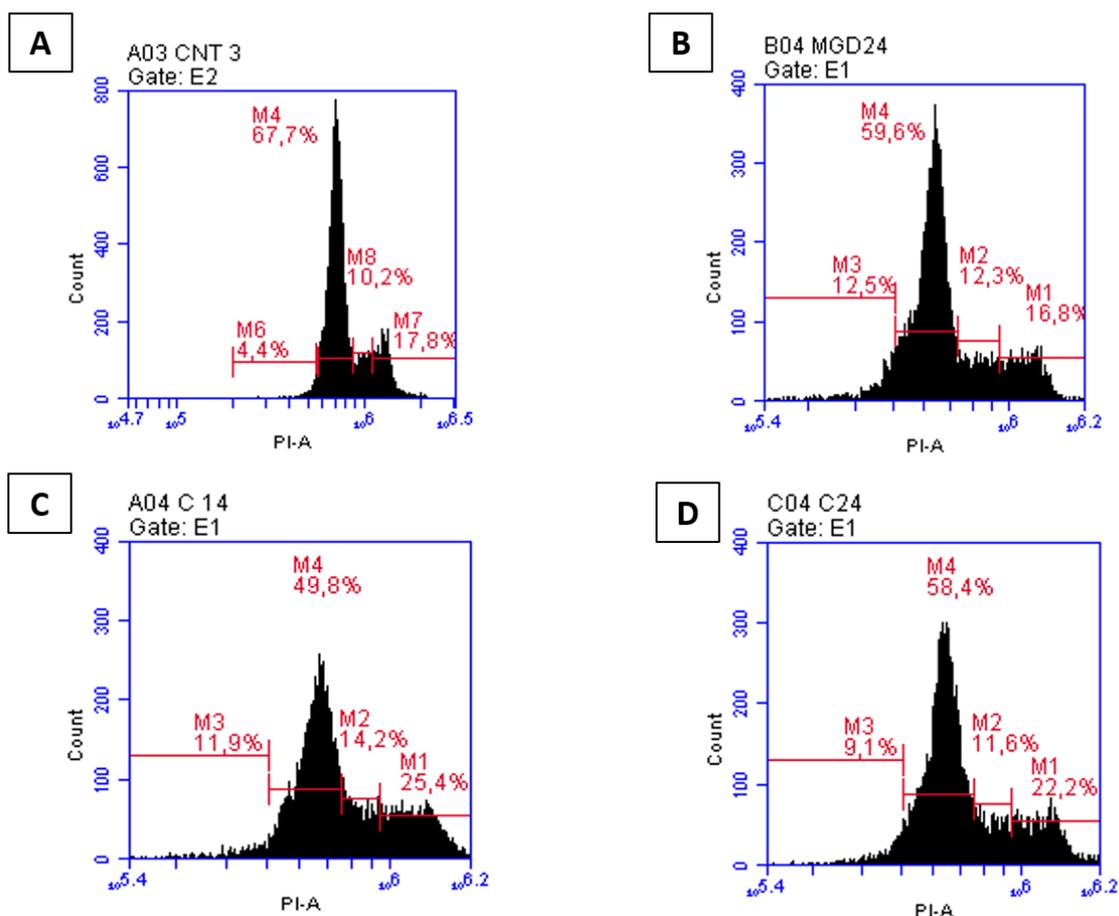


Figura 30: Análise de ciclo celular das células HeLa por citometria de fluxo com PI, após tratamento com: (A) controle negativo, (B) MGD2 (C) Composto 1 e (D) Composto 2

4.2.6 PREDIÇÃO *in silico* DE ALVOS MOLECULARES (TARGET FISHING)

A partir da realização da análise *in silico* por *target fishing* foi possível prever possíveis alvos moleculares para as substâncias isoladas de MGD. Ambos os compostos apresentaram probabilidade de terem como alvo molecular diferentes isoformas da enzima anidrase carbônica (CA): I, VII, IX XII, XIII (Tabela 7 e Tabela 8), porém com probabilidades distintas para cada substância.

Tabela 7: Predição *in silico* de alvos moleculares para o composto 1 isolado de MGD2.

Alvo Molecular	Nome Comum	Classe do Alvo	Probabilidade	Uniprot ID	ChEMBL ID	Know Actives (3D/2D)
Anidrase Carbônica VII	CA7	Liase	0,23	P43166	CHEMBL2326	10/17
Anidrase Carbônica XIII	CA13	Liase	0,23	Q8N1Q1	CHEMBL3912	10 / 18
Anidrase Carbônica XII	CA12	Liase	0,23	O43570	CHEMBL3242	28 / 31
Anidrase Carbônica IX	CA9	Liase	0,11	Q16790	CHEMBL3594	23 / 36
Anidrase Carbônica I	CA1	Liase	0,11	P00915	CHEMBL261	38 / 14

Tabela 8: Predição *in silico* de alvos moleculares para o composto 2 isolado de MGD2.

Alvo Molecular	Nome Comum	Classe do Alvo	Probabilidade	Uniprot ID	ChEMBL ID	Know Actives (3D/2D)
Anidrase Carbônica VII	CA7	Liase	0,18	P43166	CHEMBL2326	0 / 17
Anidrase Carbônica XIII	CA13	Liase	0,18	Q8N1Q1	CHEMBL3912	0 / 18
Anidrase Carbônica XII	CA12	Liase	0,11	O43570	CHEMBL3242	7 / 31
Anidrase Carbônica I	CA1	Liase	0,09	P00915	CHEMBL261	7 / 36
Anidrase Carbônica IX	CA9	Liase	0,09	Q16790	CHEMBL3594	7 / 14

4.3 DISCUSSÃO

O extrato MGD2, foi testado através do ensaio de viabilidade celular por MTT utilizando células tumorais e não tumorais. Dessa forma foram obtidos os valores de IC₅₀ de 29,82 µg/mL para HeLa e 124,9 µg/mL para NIH/3T3. A partir desses valores, foi calculado o índice de seletividade (IS: 4,18), mostrando então que tal amostra possui uma atividade antiproliferativa seletiva contra as células HeLa. A análise do ciclo celular por citometria de fluxo, revelou que MGD2 não induziu a parada do ciclo celular, no entanto aumentou significativamente a concentração de células em subG0, indicando então uma possível indução a apoptose, já que a quantidade de células apoptóticas está relacionada ao conteúdo de DNA fragmentado, o qual pode ser observado em subG0/G1 (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2010). A análise do perfil fitoquímico de MGD2 evidenciou uma similaridade com a amostra MGD (capítulo 1), no entanto, é possível notar que em MGD2 há uma concentração relativa maior de alguns compostos, incluindo os que foram isolados posteriormente no trabalho. Essa diferença pode ser explicada por características de sazonalidade e idade do indivíduo. Apesar de ambas as coletas terem sido realizadas no mesma época do ano e no mesmo indivíduo, foram realizadas em anos diferentes e em condições meteorológicas distintas o que pode ter influenciado na composição dos extratos, pois esses fatores têm grande influência na produção de metabólitos secundários (CECHINEL FILHO *et al.*, 1998). Dessa forma, é possível indicar que a atividade antiproliferativa seletiva para HeLa que foi observada para MGD2 está diretamente relacionada com a presença de compostos anotados, dentre eles os compostos isolados 1 e 2.

Através de diferentes técnicas de fitoquímica clássica, foi possível isolar a partir do extrato MGD2, dois ácidos fenólicos derivados do ácido coruleoelágico: o

composto 1 (ácido 3,3',4,4',5' – pentametil coruleoelágico) e o composto 2 (ácido 3,3',4,5,5' – pentametil coruleoelágico). O composto 1, já foi descrito anteriormente (LAKORNWONG *et al.*, 2018), porém, nunca havia sido testado para nenhuma atividade biológica. O composto 2, é uma substância inédita, descrita pela primeira vez neste trabalho.

Quando testados através do ensaio de MTT com células HeLa e NIH/3T3, ambos os compostos se mostraram citotóxicos para as células tumorais, mas sem afetar de forma significativa a viabilidade das células não tumorais. Os valores de IC₅₀ para tais linhagens refletem nos valores de IS ≥ 2 para o composto 1 (IS = 2,41) e composto 2 (IS = 3,09). Tratando-se de compostos novos, não existem dados na literatura suficientes para justificar os resultados obtidos. No entanto, como constatado por análise *in silico*, ambos os compostos isolados possuem como possível alvo molecular a enzima anidrase carbônica, a qual possui um papel crucial na carcinogênese de tumores sólidos (BENEJ *et al.*, 2014).

Os tumores sólidos crescem rapidamente devido a proliferação celular descontrolada. A medida que o crescimento do tumor avança, devido à vasculatura inadequada, surgem áreas com privação de oxigênio, resultando em uma condição conhecida como hipóxia tumoral. Essa condição é responsável por provocar alterações significativas no comportamento das células cancerosas incluindo alterações na expressão gênica e no metabolismo celular. Para resolver essa questão relacionada ao oxigênio, as células cancerosas passam a realizar glicólise anaeróbica e dessa forma é mantida a demanda energética da célula, porém é gerada uma grande quantidade de ácido láctico (que se dissocia em H⁺ e lactato) e dióxido de carbono (CO₂), que irão contribuir para a diminuição do pH extracelular

e conseqüentemente o desenvolvimento de um meio ácido no microambiente tumoral (BENEJ *et al.*, 2014; CHICHE *et al.*, 2009).

Para compensar essa acidificação e manter um ambiente favorável para o crescimento tumoral, as células cancerosas frequentemente aumentam a atividade da anidrase carbônica. A anidrase carbônica é uma metaloenzima transmembrana que atua catalisando a conversão reversível do CO₂ e água em íons bicarbonato (HCO₃⁻) e íons hidrogênio (H⁺). Portanto, a partir da reação catalisada pela anidrase carbônica são fornecidos os íons bicarbonato, que são transportados para o interior das células através de transportadores de ânions. No meio intracelular, o bicarbonato interage com os prótons liberados pelo metabolismo glicolítico, atuando como um tampão, e neutralizando o pH. Assim, o pH do microambiente tumoral se mantém favorável para o crescimento e sobrevivência das células tumorais (BENEJ *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2022; PARKS *et al.*, 2011).

A CA IX é uma isoforma da anidrase carbônica frequentemente ativada neste mecanismo para a regulação do pH no microambiente tumoral. A CA IX foi descoberta inicialmente como uma proteína presente nas membranas de células HeLa, posteriormente foi analisada a sequência genômica da proteína. Após a observação de um domínio catalítico específico para a família de CAs, a proteína foi incluída nesta família. Dessa forma, estudos indicam que o câncer de colo de útero e conseqüentemente as células HeLa apresentam grandes quantidades de anidrase carbônica, sendo então fundamental para a sua carcinogênese (OPAVSKY *et al.*, 1996; TEMIZ *et al.*, 2021).

A anidrase carbônica é um dos alvos da terapia contra o câncer, especificamente a CAIX, que é quase exclusivamente associada a tumores, e a CAXII, que aparece superexpressa em alguns tipos de câncer. Nesse sentido, é

interessante a descoberta/desenvolvimento de substâncias que inibem a anidrase carbônica, afetando então os processos de tumorigênese. No contexto do câncer, a inibição dessa enzima tem mostrado potencial terapêutico ao manter o microambiente ácido ao redor do tumor, impedindo seu crescimento e disseminação. Além disso, a inibição da anidrase carbônica é capaz de interferir na angiogênese, comprometendo o fornecimento de nutrientes e oxigênio ao tumor (BENEJ *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2022; SUPURAN *et al.*, 2015). Especificamente, a isoforma CA IX aparece superexpressa em diferentes cânceres (mama, cólon, colo do útero, melanoma e pulmão, por exemplo), no entanto, a expressão dessa enzima é restrita a alguns locais em tecidos saudáveis (ductos biliares intra-hepáticos, mucosa gástrica e duodeno) e por isso, essa enzima é um alvo estratégico na terapia contra o câncer (CAMPOS *et al.*, 2022; TEMIZ *et al.*, 2021).

Portanto, a possível inibição da enzima anidrase carbônica provocada pelos compostos isolados 1 e 2 podem justificar a atividade antiproliferativa observada no presente estudo, já que dessa forma o pH do meio em que se encontra as células não favorece a proliferação das mesmas. O fato de existirem grandes quantidades da enzima CA na membrana das células HeLa quando comparado com as células não tumorais justifica os valores de índice de seletividade observados para ambos os compostos testados.

Além disso, estudos indicam que a inibição da CA IX está diretamente relacionada a morte celular de células HeLa, uma vez que essa inibição diminui significativamente os níveis de pH intracelular, o que desencadeia as vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose. Nesse contexto, os dados indicam que a inibição de CA IX induz a apoptose ao aumentar a expressão de caspases (3, 8, 9

e 12) e do gene BAX que regula a via apoptótica. Também é observado um aumento intracelular de ROS (espécies reativas de oxigênio), os quais quando se acumulam induzem danos ao DNA que levam a apoptose celular e consequente interrupção do ciclo celular em G₀/G₁ (TEMIZ *et al.*, 2021). Esses fatos corroboram os resultados obtidos para os compostos isolados e o extrato MGD2 através da citometria de fluxo, onde foi observado um aumento do número de células em SubG₀ (12,53% para o composto 1; 8,96% para o composto 2 e 12,48% para MGD2), quando comparado com o controle negativo (4,15%), indicando uma maior população de células com DNA fragmentado, as quais possivelmente foram induzidas a apoptose. Estudos com outras linhagens celulares indicam que a inibição de CA IX parece estar relacionada com a parada de ciclo celular na fase G₂/M. Esse fato foi observado ao bloquear as anidrases carbônicas presentes na membrana das células de câncer de mama MDA-MB-231 (GÜTTLER *et al.*, 2017) e das células HCT-116 de câncer de cólon (ELDEHNA *et al.*, 2018), no entanto os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não são elucidados. Porém, esses estudos corroboram os resultados encontrados para os compostos isolados 1 e 2, que foram capazes de parar o ciclo celular das células HeLa na fase G₂/M, quando tratadas com valores correspondente ao IC₅₀. A regulação da parada do ciclo celular desempenha um papel crucial na terapia contra o câncer, uma vez que as células cancerosas têm uma propensão aumentada para evitar os mecanismos normais de controle do ciclo celular, dessa forma, a interrupção do ciclo celular impede a replicação descontrolada das células cancerosas, levando à inibição do crescimento tumoral. Por esse motivo há um grande interesse no desenvolvimento de quimioterápicos que são capazes de parar o ciclo celular de células do câncer (ALEEM e ARCECI, 2015; SALEH *et al.*, 2019).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que a espécie *Myrciaria glazioviana* (extratos e compostos isolados) apresenta um enorme potencial contra as células de câncer cervical. Dentre as amostras testadas, o extrato MGD e a fração MGA das folhas de *M. glazioviana* apresentaram resultados promissores, ao apresentarem atividade antiproliferativa seletiva frente as células HeLa, além de inibirem a migração dessa linhagem celular. Tal atividade antiproliferativa parece estar relacionada com a capacidade que essas amostras possuem de estimularem a ativação das caspases 3/7, induzindo então a morte celular por apoptose. A partir da técnica de LC-MS, foi possível identificar os compostos presentes nas amostras, as quais apresentam um perfil fitoquímico semelhante, com a predominância da presença de compostos fenólicos. Dados da literatura indicam que as atividades biológicas observadas pra MGD e MGA possuem relação direta com os compostos presentes nas amostras.

Com o intuito de realizar o isolamento de compostos bioativos, um novo extrato diclorometano das folhas de *M. glazioviana* (MGD2) foi confeccionado. Tal extrato apresentou uma atividade antiproliferativa seletiva para as células HeLa, além de induzir o aumento das células em subG0. Foi observado por LC-MS que MGD2 possui um perfil cromatográfico muito semelhante a MGD, portanto, as atividades observadas podem ser explicadas pelos compostos identificados nessa amostra, os quais apresentam atividades biológicas descritas em outros estudos.

A partir de diferentes técnicas de fitoquímica clássica, foi possível isolar do extrato MGD2 dois diferentes compostos: o ácido 3,3',4,4',5' – pentametil coruleoelágico (composto 1) e o ácido 3,3',4,5,5' – pentametil coruleoelágico

(composto 2). Ambos os compostos são derivados do ácido coruleoelágico, e apresentam atividade antiproliferativa seletiva para células HeLa, tal atividade pode estar relacionada com uma possível inibição da enzima anidrase carbônica, a qual está diretamente ligada a progressão da carcinogênese, uma vez que a partir da análise *in silico* foi possível estabelecer tal enzima como alvo molecular dos compostos 1 e 2. Ambos os compostos foram capazes de parar o ciclo celular das células HeLa na fase G2/M, além de aumentar a população de células em sub-G0. Esse resultado também parece ter relação com a inibição da anidrase carbônica, no entanto os mecanismos envolvidos não estão esclarecidos.

5.2 PERSPECTIVAS

O presente estudo é inédito, uma vez que até o momento a espécie *Myrciaria glazioviana*, incluindo os extratos e ambos os compostos isolados nunca haviam sido testados para atividade antiproliferativa, sendo que o composto 2 foi descrito pela primeira vez neste trabalho. Dessa forma, tratam-se de estudos iniciais, sendo necessários novos ensaios para essa atividade biológica.

Sendo assim, as perspectivas futuras do presente trabalho visam a realização de novos ensaios envolvendo os compostos isolados. Portanto, serão realizados ensaios que visem a elucidação dos mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa observada para ambos os compostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abotaleb M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules*. 2020; 10(2):221.

Abreu LS, Alves IM, Espírito Santo RFD, Nascimento YMD, Dantas CAG, Dos Santos GGL, Le Hyaric M, Guedes MLS, da Silva MS, Villarreal CF, Velozo EDS, Tavares JF.

Antinociceptive compounds and LC-DAD-ESIMS profile from *Dictyoloma vandellianum* leaves. *PLoS One*. 2019; 14(10):e0224575.

Agritempo 2023 – Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. Disponível em: <<https://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp>> Acesso em: 06 de Dezembro de 2023.

Aleem E, Arceci RJ. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2015;3:16.

Ávila RI, Mattos Alvarenga CB, Ávila PH, Moreira RC, Arruda AF, Fernandes TO, Rodrigues BD, Andrade WM, Batista AC, Paula Jr, Valadares MC *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) exerts chemopreventive effects against hexavalent chromium-induced damage in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Biology*. 2016; 54:2652-2663.

Bagattoli PCD, Cipriani DC, Mariano LNB, Correa M, Wagner TM, Noldin VF, Cechinel Filho V, Niero R. Phytochemical, Antioxidant and Anticancer Activities of Extracts of Seven Fruits Found in the Southern Brazilian Flora. *Indian J Pharm Sci*. 2016; 78(1): 34–40.

Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Subcell Biochem*. 2014; 75:199-219.

Bernardini S, Tiezzi A, Laghezza Masci V, Ovidi E. Natural products for human health: An historical overview of the drug discovery approaches. *Nat. Prod. Res*. 2018; Aug;32(16):1926-1950.

Borchardt JK. The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. *Drug News Perspectives*. 2002; 15,187-192.

Borges LL, Conceição EC, Silveira D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. *Food Chemistry*. 2014; v. 153, p. 224–233.

Brandão HN, David JP, Couto RD, Nascimento JAP, David JM. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quím. Nova*. 2010; v. 33, n. 6, p. 1359-1369.

Campos NSP, Souza BS, Silva GCPD, *et al*. Carbonic Anhydrase IX: A Renewed Target for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(6):1392.

Carrasco RA, Stamm NB, Patel BKR. One-Step Cellular Caspase-3/7 Assay. *BioTechniques*. 2003; 34:1064-1067.

Cechinel-Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*. 1998; 21, 99-105.

Chabner BA, Roberts TG Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005; Jan;5(1):65-72.

Chen W, Shen X, Ma L, Chen R, Yuan Q, Zheng Y, Li C, Peng, G. Phenolic Compounds from *Polygonum chinense* Induce Growth Inhibition and Apoptosis of Cervical Cancer SiHa Cells. *BioMed research international*. 2020; 8868508.

Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res*. 2009; 69(1):358–368.

Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet*. 2019; 393(10167):169-182.

Crosbie, EJ, Einstein, MH, Franceschi, S, Kitchener, HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013; 382(9895), 889–899.

Cruz AVM, Kaplan MAC. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta e Ambiente*. 2004; p.47-52.

Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao, H. Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010; 676, 137–147.

Eldehna WM, Nocentini A, Al-Rashood ST, *et al*. Tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX and XII inhibitory properties of certain isatin-bearing sulfonamides endowed with in vitro antitumor activity towards colon cancer. *Bioorg Chem*. 2018; 81:425-432.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4):495-516.

Fischer LG, Santos D, Serafin C, Malheiros A, Delle Monache F, Delle Monache G, Cechinel Filho V, de Souza MM. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. *Biol Pharm Bull*. 2008; Feb;31(2):235-9.

Flora do Brasil 2023 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10787>>. Acesso em: 21 de Setembro de 2023.

Fonseca ACC da, de Queiroz LN, Sales Felisberto J, Jessé Ramos Y, Mesquita Marques A, Wermelinger GF, ... Robbs BK. Cytotoxic effect of pure compounds from *Piper rivinoides* Kunth against oral squamous cell carcinoma. *Natural Product Research*. 2020; 1–5.

Güttler A, Theuerkorn K, Riemann A, *et al.* Cellular and radiobiological effects of carbonic anhydrase IX in human breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2019; 41(4):2585-2594.

Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, *et al.* P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia.* 2004; 18(3):401-8.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 21 de Setembro de 2023.

Kim, JY, Choi YJ, Kim HJ. (2021). Determining the effect of ellagic acid on the proliferation and migration of pancreatic cancer cell lines. *Translational cancer research.* 2021; 10(1), 424–433.

Kurtz BC, Araújo DSD. Composição florística e estrutura do componente arbóreo de um trecho de Mata Atlântica na Estação Ecológica Estadual do Paraíso, Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia.* 2000; 51, 69-115.

Lakornwong W, Kanokmedhakul K, Kanokmedhakul S. A new coruleoellagic acid derivative from stems of *Rhodamnia dumetorum*. *Natural Product Research.* 2018; 32(14), 1653–1659.

Malavolta E, Leme Jun J, Gurgel JTA, Soubihe Sobro J. Ascorbic acid content in fruits of *Myrciaria glomerata* Berg. *Nature.* 1956; 178, 424.

Moresco HH, Colla G, Cavalcante ID, Queiroz GS, Pizzolatti MG, Brighente IMC. Chemical constituents of *Eugenia catharinae* and their antioxidant activity. *Nat Prod Res.* 2016; 13:1–5.

Munvera AM, Ouahouo BMW, Mkounga P, Mbekou MIK, Nuzhat S, Choudhary MI, Nkengfack AE. Chemical constituents from leaves and trunk bark of *Rinorea oblongifolia* (Violaceae). *Natural Product Research.* 2019; Volume34, Issue 14, Pages 2014-2021.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020; 83(3):770-803.

Nordin N, Yeap SK, Rahman HS, *et al.* In vitro cytotoxicity and anticancer effects of citral nanostructured lipid carrier on MDA MBA-231 human breast cancer cells. *Sci Rep.* 2019; 9(1):1614.

Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, Gibadulinova A, Stanbridge EJ, Zavada J, Kettmann R, Pastorek J. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics.* 1996; 33(3):480–487.

Pacheco-Silva NV, Donato AM. Morpho-anatomy of the leaf of *Myrciaria glomerata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016; v. 26, n. 3, p. 275-280.

Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol*. 2011; 226(2):299–308.

Pereira MTM, Alves TP, Lopez BGC, Mendonça LS, Sawaya ACHF, Pascoal ACRF. *Myrciaria Glazioviana* Leaves Anti-Inflammatory, Anti-nociceptive, Hepatoprotection Potential, and Chemical Profile by Mass Spectrometry. *Biomed J Sci & Tech Res*. 2019; 14(2) – p. 10507 – 10511.

Pereira MTM, Charret TS, Lopez BGC, Carneiro MJ, Sawaya ACHF, Pascoal VDB, Pascoal, ACRF. The in vivo anti-inflammatory potential of *Myrciaria glazioviana* fruits and its chemical profile using mass spectrometry. *Food Bioscience*. 2020; 38, 100777, ISSN 2212-4292.

Pereira MTM, Charret TS, Pascoal VDB, Machado RLD, Rocha LM, Pascoal ACRF. *Myrciaria* Genus: Bioactive Compounds and Biological Activities. *Chem Biodivers*. 2022; Dec;19(12):e202200864.

Pilon AC, Gu H, Raftery D, da Silva Bolzani V, Lopes NP, Castro-Gamboa I, Carnevale Neto F. Correction to Mass Spectral Similarity Networking and Gas-Phase Fragmentation Reactions in the Structural Analysis of Flavonoid Glycoconjugates. *Anal Chem*. 2019; Nov 19;91(22):14780-14781.

Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Epifanio NPLERA. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Quim. Nova*. 2002; 25(0):45-61.

Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*. 2006; v.6, n.10, p.789-802.

Radha Abbas Hasoon, M, Jawad Kadhim, N. Improvement of the Selectivity Index (SI) and Cytotoxicity Activity of Doxorubicin Drug by *Panax ginseng* Plant Extract. *Archives of Razi Institute*. 2021; 76(3), 659–666.

Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HMI. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2013; 45:2821–2831.

Rerucha CM, Caro RJ, Wheeler VL. Cervical Cancer Screening. *Am Fam Physician*. 2018; Apr 1;97(7):441-448.

Robbins & Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças/ Vinay Kumar, Abul Abbas, Jon Aster; com ilustrações de James A. Perkins. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016, p. 269-348.

Saleh KA, Albinhassan TH, Elbehairi SEI, Alshehry MA, Alfaifi MY, Al-Ghazzawi AM, Al-Kahtani MA, Alasmari AD. Cell Cycle Arrest in Different Cancer Cell Lines (Liver, Breast, and Colon) Induces Apoptosis under the Influence of the Chemical Content of *Aeluropus lagopoides* Leaf Extracts. *Molecules*. 2019;24(3):507.

Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutical Scientia*. 2011; 1: 25-41.

Seca AML, Pinto DCGA. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19:263.

Serafin C, Nart V. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 17, 578-592.(b)

Serafin C, Nart V. Bioactive phenolic compounds from aerial parts of *Plinia glomerata*, *Z Naturforsch C*. 2007; 62,196-200. (a)

Singh A, Bajpai V, Kumar S, Sharma KR, Kumara B. Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Nat Prod Commun*. 2016; Feb;11(2):239-44.

Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., Lucas, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015; (<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB171>)

Supuran CT, Winum JY. Carbonic anhydrase IX inhibitors in cancer therapy: an update. *Future Med Chem*. 2015; 7(11):1407-1414.

Temiz E, Koyuncu I, Durgun M, *et al*. Inhibition of Carbonic Anhydrase IX Promotes Apoptosis through Intracellular pH Level Alterations in Cervical Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(11):6098.

Vigbedor BY, Akoto CO, Neglo D. Isolation and characterization of 3,3'-di-O-methyl ellagic acid from the root bark of *Azelia africana* and its antimicrobial and antioxidant activities. *Scientific African*. 2022; Volume 17, e01332.

Wahle KW, Brown I, Rotondo D, Heys SD. (2010). Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010; 698, 36–51.

Wanderley CW, Colón DF, Luiz JPM, Oliveira FF, Viacava PR, Leite CA, Pereira JA, Silva CM, Silva CR, Silva RL, Speck-Hernandez CA, Mota JM, Alves-Filho JC, Lima-Junior RC, Cunha TM, Cunha FQ. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. *Cancer Res.* 2018; Oct 15;78(20):5891-5900.

Wang F, Chen J, Xiang D, Lian X, Wu C, Quan J. (2020). Ellagic acid inhibits cell proliferation, migration, and invasion in melanoma via EGFR pathway. *American journal of translational research.* 2020; 12(5), 2295–2304.

WHO – World Health Organization. 2021. Global Cancer Observatory. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 21 de Setembro de 2023.

Yousuf M, Shamsi A, Khan P, Shahbaaz M, AlAjmi MF, Hussain A, Hassan GM, Islam A, Rizwanul Haque QM, Hassan MI. (2020). Ellagic Acid Controls Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells via Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase 6. *International journal of molecular sciences.* 2020; 21(10), 3526.

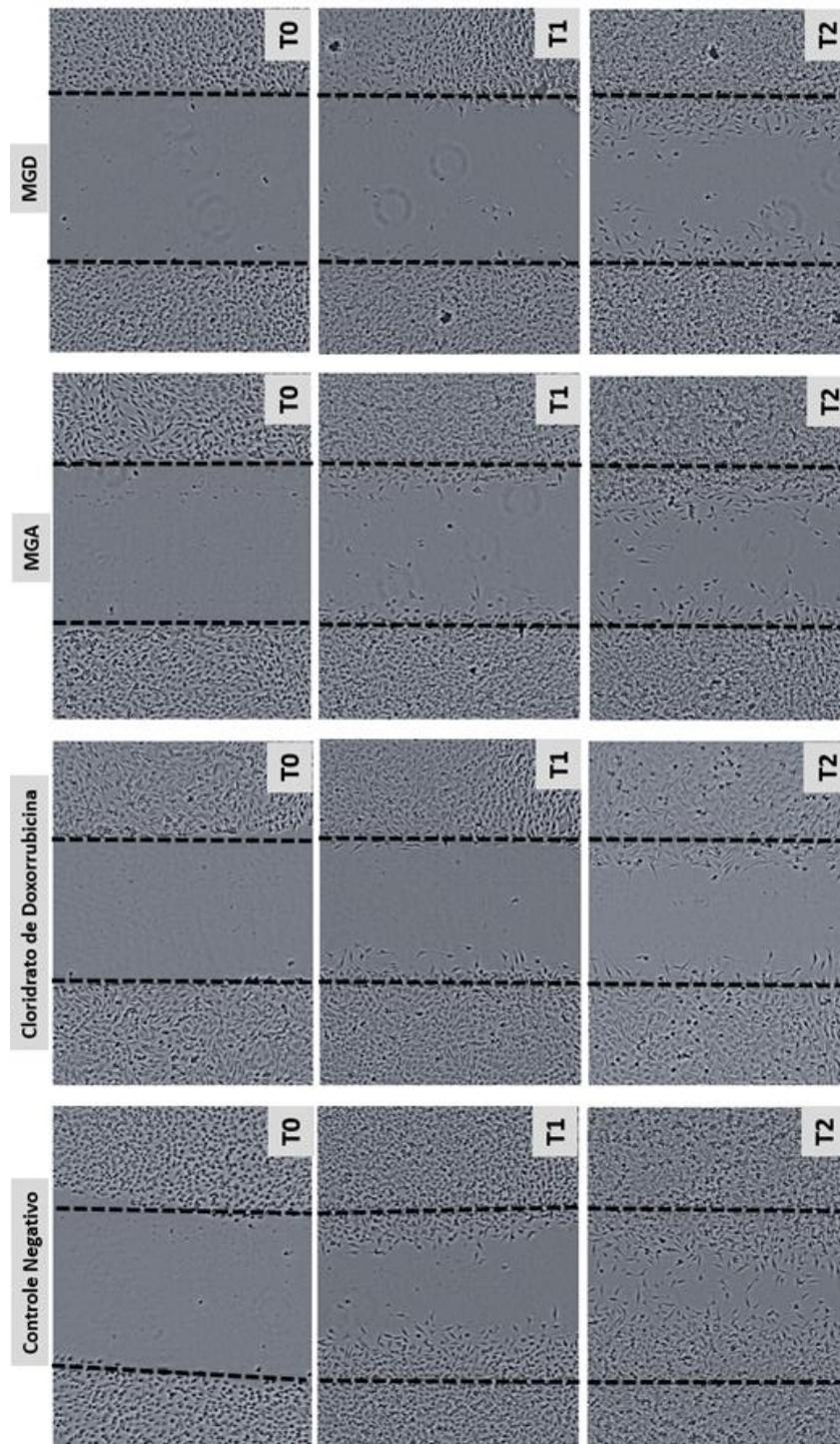
Yuan R, Hou, Y, Sun W, Yu J, Liu X, Niu Y, Lu JJ, Chen X. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2017; 1401(1):19-27.

Zhang Y, Guo Y, Wang M, Dong H, Zhang J, Zhang L. Quercetrin from *Toona sinensis* leaves induces cell cycle arrest and apoptosis via enhancement of oxidative stress in human colorectal cancer SW620 cells. *Oncology reports.* 2017; 38(6), 3319–3326.

Zorzanelli BC, de Queiroz LN, Santos RM, Menezes LM, Gomes FC, Ferreira VF, ... Robbs BK. (2018). Potential cytotoxic and selective effect of new benzo[b]xanthenes against oral squamous cell carcinoma. *Future Medicinal Chemistry.* 2018 10(10), 1141–1157.

8. ANEXO

8.1 IMAGENS MICROSCÓPICAS DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR



Anexo 1: Imagens microscópicas do ensaio de migração celular. Imagens obtidas através do microscópio EVOS (aumento de 10x), dos grupos Controle Negativo, Doxorrubicina 1,75 µg/mL, MGA 15 µg/mL e MGD 30µg/mL, antes (T0) e após 12 e 24h do tratamento (T1 e T2 respectivamente).