

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

ANGELLA MACARIO TARDINI

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL
EpNRP I ISOLADO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE VEGETAL
Eugenia punicifolia (Kunth) DC.**

Bragança Paulista

2020

ANGELLA MACARIO TARDINI – RA. 001201909033

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL
EpNRP I ISOLADO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE VEGETAL
Eugenia punicifolia (Kunth) DC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Giovanna Barbarini Longato

Bragança Paulista
2020

QV 269 Tardini, Angella Macario.
T19a Atividade antiproliferativa do Óleo Essencial EpNRP I
isolado das folhas da espécie vegetal *Eugenia punicifolia*
(*Kunth*) DC / AngellaMacarioTardini. -- Bragança Paulista,
2020.
48 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciência da Saúde da Universidade São
Francisco.

Orientação de: Giovanna Barbarini Longato.

1. Compostos naturais. 2. Óleo essencial. 3. Neoplasias.
4. Antiproliferativo. 5. *Eugenia punicifolia*. I. Longato,
Giovanna Barbarini. II. Título.



TARDINI, Angella Macario. “Atividade antiproliferativa do óleo essencial EpNRP I isolado das folhas da espécie vegetal *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 17 de dezembro de 2020 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Giovanna Barbarini Longato - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Humberto Moreira Spindola
Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Raquel de Cássia dos Santos
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Thaís Parisotto Ulmer
Universidade São Francisco

Dedico este trabalho a Deus, por ter sempre me dado forças e vitórias em meu trajeto.

Aos meus familiares mãe Lourdes, esposo Hélio e filhas Marcella e Marianna.

Aos meus amigos e professores e à minha orientadora Dra. Giovanna Barbarini Longato.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força, coragem e fé durante essa trajetória, principalmente nas horas difíceis, as quais foram muitas, e assim, não me permitiu cair em desânimo e desistir nesses anos de mestrado, e que nunca me deixou esquecer que pelas minhas filhas tudo valeria a pena. Tenho plena certeza que sem ti jamais teria chegado até aqui;

À minha família, minha mãe, meu marido Hélio e minhas filhas amadas Marcella e Marianna as quais me apoiaram durante esses quatro anos de mestrado, me dando motivação, amor, carinho, paciência, inspiração e por sempre estarem ao meu lado, em especial a Marcella que de maneira singular e dedicada se desdobrou para estar o tempo todo colaborando comigo, a minha gratidão;

À minha querida orientadora, Profa Dra. Giovanna Barbarini Longato, a quem devo total gratidão pelos ensinamentos e conhecimentos adquiridos em todo o desenvolvimento do meu mestrado, por me permitir realizar um projeto sob sua orientação, sem medir esforços, levando em consideração todas as minhas limitações como aluna. E pela oportunidade de conhecê-la e saber quão maravilhosa ela é, um exemplo de pessoa e professora a ser seguida, a minha gratidão;

A todos que fazem parte da família USF, em especial a querida amiga Carolina Afonso por toda atenção, paciência e apoio dirigido a mim, ao colega Ian onde participou de muitos momentos no biotério, a colega Júlia por contribuir com seus experimentos, ao amigo Felipe por compartilhar suas experiências e experimentos, deixo meu agradecimento;

Ao pessoal do Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Molecular e Compostos Bioativos (USF), que sempre me receberam tão bem, à Andrea de Souza Fernandes por dar suporte em todas as etapas dessa trajetória, deixo meu agradecimento;

À Universidade São Francisco e seus professores da Pós que estiveram presentes nas aulas específicas do mestrado em especial à Profa. Dra. Raquel de Cássia dos Santos pela parceria e à Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho pelo apoio em tornar possível essa conquista nesta etapa final, a minha gratidão;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.337678/2019-00.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro (2018/19436-7 e 2016/06137-6) para desenvolvimento do projeto de pesquisa e à Universidade São Francisco pela infra-estrutura e oportunidade oferecidas por todos esses anos de conhecimentos adquiridos e também pelo apoio a nós estudantes.

“ As pessoas são solitárias porque constroem muros ao invés de pontes” –

O pequeno príncipe.

RESUMO

Câncer é o conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células e que podem eventualmente invadir tecidos e órgãos, num processo denominado metástase. A quimioterapia, um dos principais tratamentos desta doença, muitas vezes consiste na combinação de diversos medicamentos altamente tóxicos, que agem sistemicamente e não restringem sua ação somente às células tumorais. Dessa forma, há necessidade de investigar novas moléculas para o desenvolvimento de fármacos que sejam mais eficientes em induzir morte apenas nas células tumorais, que sejam de fácil administração, que não causem resistência e com poucos ou insignificantes efeitos adversos. Neste âmbito, os produtos naturais são considerados as maiores fontes de substâncias ativas de utilização na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos e, dentre eles, tem sido crescente o interesse em óleos essenciais obtidos de espécies vegetais devido às múltiplas funções que apresentam, destacando-se a antitumoral. Por meio deste trabalho, propôs-se analisar a atividade antiproliferativa do óleo essencial EpNRP I isolado das folhas da espécie vegetal *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC, “cereja do cerrado”. A investigação da atividade antiproliferativa foi inicialmente realizada em painel contendo as linhagens tumorais U-251 (glioblastoma), MCF7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário resistente), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (colon) e uma linhagem não-tumoral HaCaT (queratinócito). A amostra mostrou-se eficaz, apresentando baixos valores de GI₅₀ (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento celular) para cinco linhagens avaliadas, sendo U-251 (glioblastoma) e MCF7 (mama) as linhagens mais sensíveis ao tratamento. Considerando que o câncer de mama é bastante incidente entre mulheres brasileiras e, tendo-se em vista que o tratamento atual ainda traz muitos efeitos adversos às pacientes, optou-se por dar sequência no estudo com essa linhagem. Observou-se que o óleo essencial também foi capaz de inibir em 63% a formação de colônias de células tumorais de mama (MCF7), corroborando o resultado antiproliferativo. Um dos ensaios para investigar o mecanismo de ação revelou que o óleo essencial age inibindo a progressão do ciclo celular na fase S, assim como o quimioterápico etoposídeo e, portanto, investigações acerca do seu papel na enzima topoisomerase devem ser realizadas, a fim de compreender seu mecanismo antiproliferativo. Ademais, tendo em vista a potencial ação de reversão do mecanismo de resistência a múltiplos fármacos que produtos naturais têm demonstrado possuir, estudos de combinação do óleo essencial EpNRP I com quimioterápicos devem ser realizados para investigar a sua potencial ação adjuvante no tratamento antitumoral. Conclui-se que o óleo essencial EpNRP I possui propriedades antiproliferativa e anticlonogênica promissoras, as quais devem ser melhor exploradas pelo aprofundamento dos estudos.

Palavras-chave: Compostos naturais. Óleo essencial. Antiproliferativo. Câncer. *Eugenia punicifolia*.

ABSTRACT

Cancer is a set of more than 100 diseases which have in common the disordered growth of cells and that can eventually invade tissues and organs, in a process called metastasis. Chemotherapy, one of the main treatments for this disease, often consists in combination of several highly toxic drugs, which act systemically and do not only restrict their action on tumor cells. Therefore, there is a need to investigate new molecules for the development of drugs that are more efficient in inducing death only in tumor cells, which are easy to administer, do not cause resistance and have a few or negligible adverse effects. In this context, natural products are considered the major sources of active substances to use in therapy, due to structural diversity of metabolites produced and, among them, there has been a growing interest in essential oils obtained from plant species due to the multiple functions they present, highlighting anticancer. The aim of this work was to analyze the antiproliferative activity of EpNRP I essential oil isolated from the leaves of the plant species *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC, known as “cereja-do-cerrado. The investigation of antiproliferative activity was initially carried out in a panel containing tumor cell lines U-251 (glioblastoma), MCF7 (breast), NCI/ADR-RES (resistant ovary), PC-3 (prostate), OVCAR-3 (ovary), HT-29 (colon) and HaCaT (keratinocyte) non-tumoral cell line. The sample proved to be effective, presenting low values of GI₅₀ (minimum concentration necessary to inhibit 50% of cell growth) for five strains evaluated, being U-251 (glioblastoma) and MCF7 (breast) the most sensitive strains to treatment. The essential oil was also able to inhibit the formation of breast tumor cells (MCF7) colonies by 63%, corroborating the antiproliferative result. One of the tests to investigate the mechanism of action revealed that the essential oil acts by inhibiting the progression of the cell cycle in the S phase, as well as the etoposide chemotherapy and, therefore, investigations about its role in the enzyme topoisomerase must be performed in order to understand its antiproliferative mechanism. In addition, studies of combining oil with chemotherapeutic agents should be carried out to investigate its potential adjuvant action in antitumoral treatment. In conclusion, EpNRP I essential oil has promising antiproliferative and anti-clonogenic properties, which should be better explored by further studies.

Keywords: Natural compounds. Essential oil. Antiproliferative. Câncer. *Eugenia punicifolia*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection* (banco de células comerciais dos EUA)

B- Macromolécula Biológica

CCET - Centro de Ciência e Tecnologia

GC-MS - *gas chromatography-mass spectrometry* (espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa)

CO₂ - Dióxido de Carbono

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EpNRP I - Óleo essencial isolado das folhas de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC

GI₅₀- 50% growth inhibition (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento celular)

G₂ - (Gap) Fase de checagem do ciclo celular

INCA - Instituto Nacional de Câncer

M - Fase mitótica do ciclo celular

MCF7 - Adenocarcinoma de mama

MDR -*Multidrug resistance* (resistência a múltiplas drogas)

MTT - *3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (sal tetrazólico)

N- Produto natural inalterado

NB- Droga botânica

NCI -*National Cancer Institute* (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)

NM- Produto natural mimetizado

ND- Derivado de produto natural

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PI - *Propidium iodide* (iodeto de propídio)

PS - Penicilina/estreptomicina

ROS - *Reactive oxygen species* (espécie reativa de oxigênio)

RPMI - Meio de cultivo celular

S - Fase de síntese do ciclo celular

S - Droga sintética

S* - Droga sintética farmacóforo de produto natural

SFB - Soro fetal bovino

UFMA - Universidade Federal do Maranhão

V - Vacina

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Linhagens celulares utilizadas no ensaio antiproliferativo, com suas respectivas densidades de inoculação.....	26
TABELA 2. Rendimento e composição do óleo essencial EpNRP I	30
TABELA 3. Valores de GI ₅₀ (µg/mL) após 48h de tratamento	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, em mulheres, estipulados para 2020	16
FIGURA 2. Porcentagem de todas as drogas anticâncer aprovadas de 1981 a 2019, divididas por categoria	18
FIGURA 3. Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular	19
FIGURA 4. Partes da espécie <i>Eugenia punicifolia</i>	21
FIGURA 5. Atividade antiproliferativa do composto EpNRP I.....	33
FIGURA 6. Atividade antiproliferativa do quimioterápico cloridrato de doxorubicina	34
FIGURA 7. Colônias MCF7 formadas após tratamento com DMSO (A) e EpNRP I (B) na concentração de 7 µg/21 dias	36
FIGURA 8. Número de colônias MCF7 formadas após 21 dias de tratamento	36
FIGURA 9. Quantificação de células MCF7 (mama) após 24 horas de tratamento com veículo (DMSO), etoposídeo (10 µM = 5.89 ug/mL) e EpNRP I (7 µg/mL)	37

SUMÁRIO

1.1 CÂNCER.....	15
1.1.1 QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL BASEADA EM PRODUTOS NATURAIS..	17
1.2 FAMÍLIA MYRTACEAE, GÊNERO EUGENIA E ESPÉCIE VEGETAL EUGENIA PUNICIFOLIA	20
1.2.1 Família Myrtaceae	20
1.2.2 Gênero Eugenia.....	20
1.2.3 Espécie vegetal Eugenia puniceifolia	20
1.3 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	22
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL EpNRP I	24
3.2 CULTIVO CELULAR	24
3.2.1 Linhagens Celulares.....	24
3.2.2 Congelamento e descongelamento de células.....	25
3.3 SCREENING IN VITRO	25
3.3.1 Experimento de atividade antiproliferativa.....	25
3.4 Experimento de formação de colônias (clonogenic assay).....	27
3.5 Quantificação de células em fases do ciclo celular	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL EpNRP I.....	29
4.2 EXPERIMENTO DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	32
4.3 EXPERIMENTO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (CLONOGENIC ASSAY).....	35
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM FASE DO CICLO CELULAR	36
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
7. ANEXO- CADASTRO NO SISGEN	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer é descrito como um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, as quais podem migrar para tecidos e órgãos em um processo denominado metástase. As causas dessas doenças são inúmeras, que podem estar atreladas a fatores externos como meio ambiente, maus hábitos de vida ou fatores internos genéticos pré-determinados, podendo estar relacionados entre si (ARAÚJO; SÁ; ATTY, 2016).

Existem mecanismos muito precisos que controlam o equilíbrio entre proliferação e a morte das células (MARTINS, 2014); entretanto, mutações genéticas e alterações epigenéticas adquiridas podem ocasionar desequilíbrio nesses mecanismos, que progressivamente transformam células normais em células malignas (ANDRADE et al., 2019).

As células malignas infringem as regras mais básicas de comportamento pelas quais os organismos multicelulares são construídos e mantidos, aproveitam da capacidade de crescimento descontrolado e desorganizado, desencadeando a formação de tumores malignos, que têm a capacidade de invadir o tecido local, se espalhar para os linfonodos regionais e, comumente, desencadear metástase para órgãos distantes do corpo, causando mortalidade (ANDRADE et al., 2019).

A incidência da mortalidade por câncer tem expandido em todo o mundo. Os argumentos pelos quais esses índices estão expandindo são ainda investigados, mas apontam para o envelhecimento da população, o que releva esta doença como um problema de saúde pública mundial, sendo a segunda causa de morte por doenças no Brasil, mantendo atrás somente das doenças cardiovasculares (BRAY et al., 2018; MONDAL et al., 2012).

Devido ao elevado índice de mortalidade, o câncer tem sido alvo de constantes pesquisas. Em 2015, neoplasias malignas foram responsáveis por aproximadamente 240 mil mortes (GUERRA et al., 2017). Para o Brasil, a estimativa para cada ano do biênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma), aumentando a relevância do problema desta doença no país (INCA, 2020). O câncer de mama é a neoplasia maligna de maior incidência na população feminina (Figura 1), compreendendo, aproximadamente, 29,7% de todos os cânceres em mulheres e a segunda maior

causa de morte por câncer no mundo (BRAY et al., 2018).

Embora tenham a mesma origem tecidual, os carcinomas de mama apontam etiologia heterogênea, com mutações gênicas que acabam na extinção da função supressora de tumor e sinalização cruzada das vias de transdução de sinais, o que indica a heterogeneidade molecular e morfológica desta neoplasia. A heterogeneidade tumoral demonstra as características clínicas da doença, o desempenho metastático e a conclusão terapêutica. Então, tumores com a mesma especificação histológica podem mostrar diferenças no perfil molecular, o que pode determinar diferenças no curso biológico da doença e no resultado ao tratamento (SILVA, 2019).



	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
	Cólon e reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.590	7,4%
	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
	Glândula tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

FIGURA 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, em mama, estipulados para 2020, exceto câncer de pele não melanoma. Fonte: INCA, 2019.

Os tratamentos desta doença visam expandir a vida útil do paciente pela busca da melhora na sua qualidade de vida. Dentre eles, destacam-se a cirurgia, que retira o tumor; a radioterapia, que utiliza radiações para destruí-lo; a quimioterapia, que é à base de medicamentos e a imunoterapia, que estimula a imunidade antitumoral. De maneira geral, os agentes antineoplásicos atuam a nível do ciclo celular, interferindo em alguma das fases de seu crescimento e proliferação. Dentre os diferentes mecanismos de ação dos fármacos utilizados na quimioterapia, podemos citar: dano direto ao DNA e a condução à apoptose; inibição do processo mitótico; ação sobre microtúbulos (SILVA-NETA, 2017; PENATTI, 2019).

Neste âmbito, existe um considerável interesse científico e comercial na descoberta de novos agentes antitumorais a partir de fontes de produtos naturais (ANDRADE et al., 2019). Então, esforços estão sendo realizados por pesquisadores na tentativa de explorar a natureza à procura de novas substâncias com potencial de atividade antitumoral ou que melhorem a ação de quimioterápicos já existentes (ALVARENGA et al., 2014; AMARAL, 2014).

1.1.1 Quimioterapia antitumoral baseada em produtos naturais

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% das pessoas ainda contam com medicamentos tradicionais baseados em plantas para cuidados primários de saúde e 80% de 122 drogas derivadas de plantas foram pertinentes ao seu objetivo etnofarmacológico original. O discernimento associado à medicina tradicional viabilizou novas investigações de plantas medicinais como potenciais medicamentos e levou ao isolamento de muitos produtos naturais que se tornaram produtos farmacêuticos bem conhecidos (ANDRADE et al., 2019).

O avanço das ciências naturais e suas tecnologias tornou capaz aprimorar o uso de metabólitos secundários naturais no tratamento de doenças, a partir de extrações, purificações e, até mesmo, da síntese destes compostos bioativos (SANTOS, 2019), trazendo um grande caminho para o bem-estar humano (NEWMAN & CRAGG, 2016).

A busca pelos quimioterápicos antitumorais iniciou durante a Segunda Guerra Mundial e, em decorrência das drogas descobertas, proporcionaram o impulso para definir em 1955 o esforço nacional de desenvolvimento de medicamentos conhecido como Centro de Serviço Nacional de Quimioterapia contra o Câncer (DEVITA & CHU, 2008).

Ainda na década de 1950, a capacidade dos produtos naturais serem agentes antitumorais, foi reconhecida pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI). Os agentes antitumorais foram investigados a partir de fontes vegetais e foram obtidos resultados satisfatórios com os alcalóides vinca (vimblastina e vincristina), camptotecina, diterpeno taxol e com a lignana podofilotoxina (BRANDÃO et. al., 2010; PRAKASH; KUMAR; KUMAR, 2013), os quais se tornaram exemplos relevantes de medicamentos utilizados clinicamente no tratamento de diferentes tipos de câncer (NEWMAN & CRAGG, 2020) e, desde então, vários estudos contribuíram de forma significativa para a descoberta de novos agentes antitumorais.

Do início de 1981 até o final de 2019, foram registrados um total de 247 drogas contra o

câncer no mundo, sendo que 71% (Figura 2) desses medicamentos são oriundos de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2020).

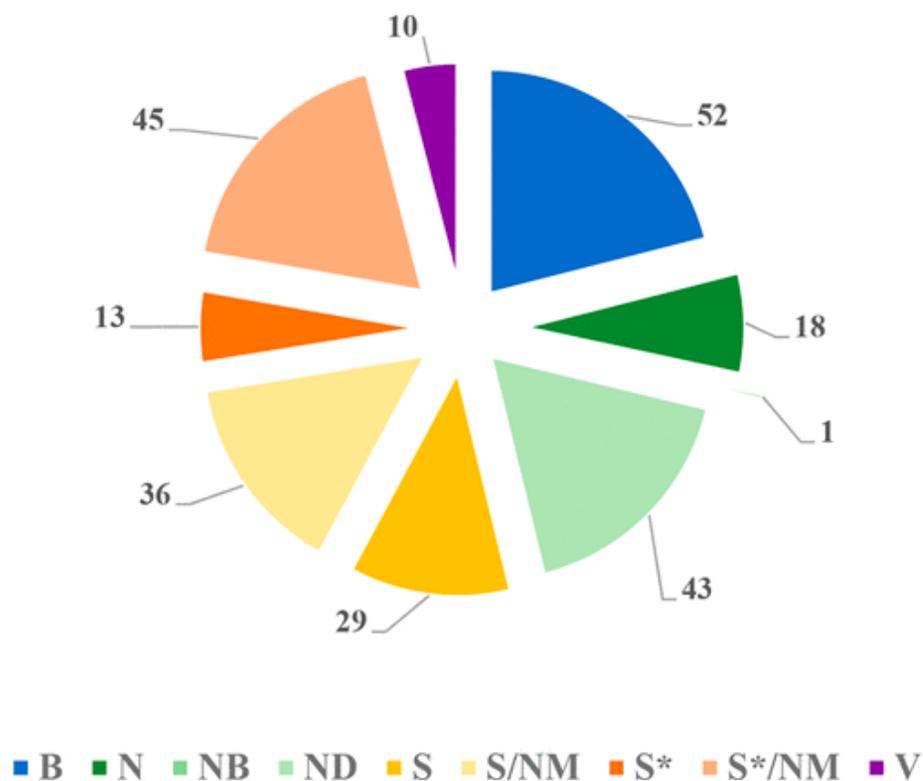


FIGURA 2. Percentual de drogas anticâncer aprovadas de 1981 a 2019, divididas por categoria. Observar que 71% é oriunda ou foi sintetizada com base em produtos naturais. B: macromolécula biológica, N: produto natural inalterado, NB: droga botânica, ND: derivado de produto natural, S: droga sintética, S*: droga sintética farmacóforo de produto natural, V: vacina, NM: produto natural mimetizado. Fonte: Newman & Cragg, 2020.

Conforme apontado, os produtos naturais são conceituados como as maiores fontes de substâncias ativas de utilização na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos (BRANDÃO et al., 2010). Considerando as características temporais e evolutivas, nós estamos apenas iniciando a exploração da diversidade molecular de produtos naturais, sendo que muitos compostos com grande potencial biológico esperam serem descobertos, guardando o desafio de como acessar essa diversidade química natural (ANDRADE et al, 2019).

É importante salientar que os produtos naturais interferem na iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer através da modulação de vários mecanismos incluindo proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástase (ANDRADE, 2018; RAJESH et al, 2015). Os

quimioterápicos comumente utilizados na clínica e oriundos de produtos naturais como os alcaloides vinca, taxanos e derivados da podofilotoxina, são capazes de impedir a proliferação celular por inibirem as enzimas topoisomerasas e agirem sobre as tubulinas que compõem os microtúbulos, componentes de citoesqueleto celular (CRAGG & NEWMAN, 2003). Por assim fazerem, promovem parada do ciclo celular nas fases G₁, S e G₂ da intérfase, bem como no início da mitose (Figura 3).

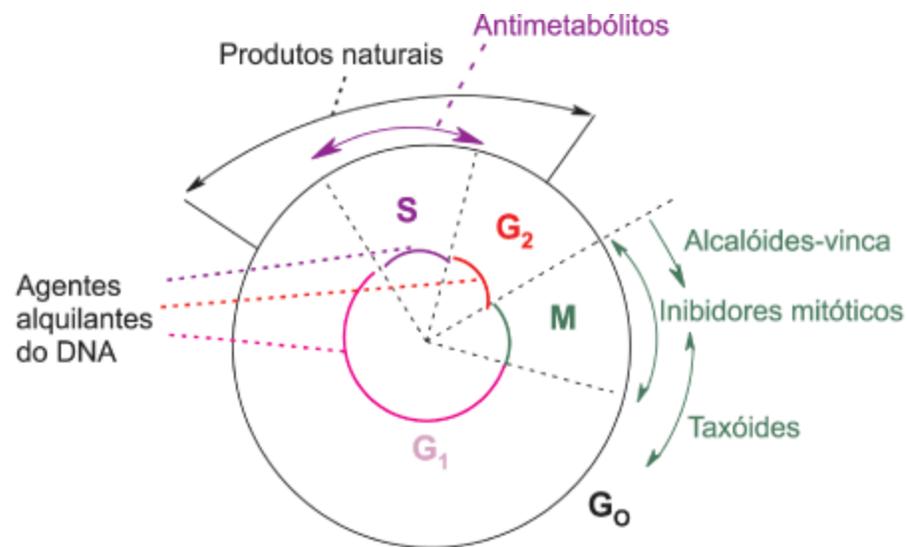


FIGURA 3. Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos, dependendo da fase do ciclo celular (ALMEIDA, 2005).

Ademais, os produtos naturais representam uma fonte rica para a descoberta e desenvolvimento de drogas promissoras na terapia de combinação em associação com quimioterápicos padrões, por aumentar as concentrações intracelulares de drogas quimioterápicas ou promover efeito terapêutico aditivo (BISHAYEE & SETHI, 2016; YUAN et al, 2017).

Neste âmbito, é importante ressaltar a necessidade de mais pesquisas, com a finalidade de investigar novas biomoléculas para o desenvolvimento de fármacos que auxiliam na destruição das células tumorais, acompanhado à uma fácil administração, que não provoque resistência ou muitos efeitos adversos (BIGOLIN, 2016).

1.2 FAMÍLIA MYRTACEAE, GÊNERO EUGENIA E ESPÉCIE VEGETAL *EUGENIA PUNICIFOLIA*

1.2.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae está dividida em duas subfamílias, Myrtoideae e Psiloxylodeae, sendo que a subfamília Myrtoideae compreende 15 tribos, que concentra 49 gêneros e cerca 2500 espécies, dentre elas espécies frutíferas como a goiabeira (*Psidium guajava* L.) e a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). A família Myrtaceae apresenta uma estimativa de 132 gêneros e mais de 5600 espécie no mundo, sendo que no Brasil, a família Myrtaceae possui ocorrências confirmadas em todos os estados, e se encontra entre as 10 famílias com maior riqueza de espécies, sendo composta por 23 gêneros e um pouco mais de 1.000 espécies (FRANCO, 2018).

1.2.2 Gênero Eugenia

O gênero *Eugenia* atinge mais de 1.000 espécies em todo o mundo, sendo um dos maiores gêneros e mais importantes da família Myrtaceae, distribuídas desde o sul do México até o Uruguai e Argentina, com um pequeno número de espécies na África. No Brasil, é encontrado comumente na Floresta Atlântica (CALIARI, 2013).

Análises fitoquímicas demonstraram que esse gênero é rico em metabólitos secundários do tipo compostos fenólicos, como taninos e flavonóides, além de terpenóides (ALBUQUERQUE, 2020; ARANHA, 2014). Além disso, segundo ROMAGNOLO & SOUZA (2006) muitas das espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* são ricas em óleos essenciais que são frequentemente utilizados na medicina popular, por apresentarem atividades como: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiinflamatória, antidiabética, analgésica, hipotensiva, gastroprotetora, hepatoprotetora, cardioprotetora, antidiarreica, antialérgica, antipirética, antineoplásica, quimiopreventiva e anticlastogênica (DAMETTO et. al., 2017).

1.2.3 Espécie vegetal Eugenia punicefolia

A espécie *Eugenia punicefolia* (Figura 3) é conhecida popularmente como cereja-do-cerrado, por ser muito comumente encontrada neste bioma (DURIGAN, 2004). A espécie também recebe o nome de insulina vegetal devido a sua importância relacionada ao tratamento de diabetes (FRANCO, 2018).

Em estudo publicado por Galeno e colaboradores (2014), os extratos desta espécie vegetal se mostraram com potente atividade antioxidante *in vitro*. Atividades biológicas gastroprotetoras e anti-inflamatórias foram observadas em roedores quando submetidos a tratamentos com o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (DE ALBUQUERQUE, 2020). Outro estudo mostrou a eficiência do extrato de folhas de *Eugenia punicifolia* no tratamento de diabetes mellitus tipo 2 em ratos (BASTING, 2012). Nenhum artigo sobre a atividade antitumoral desta espécie vegetal foi encontrado.

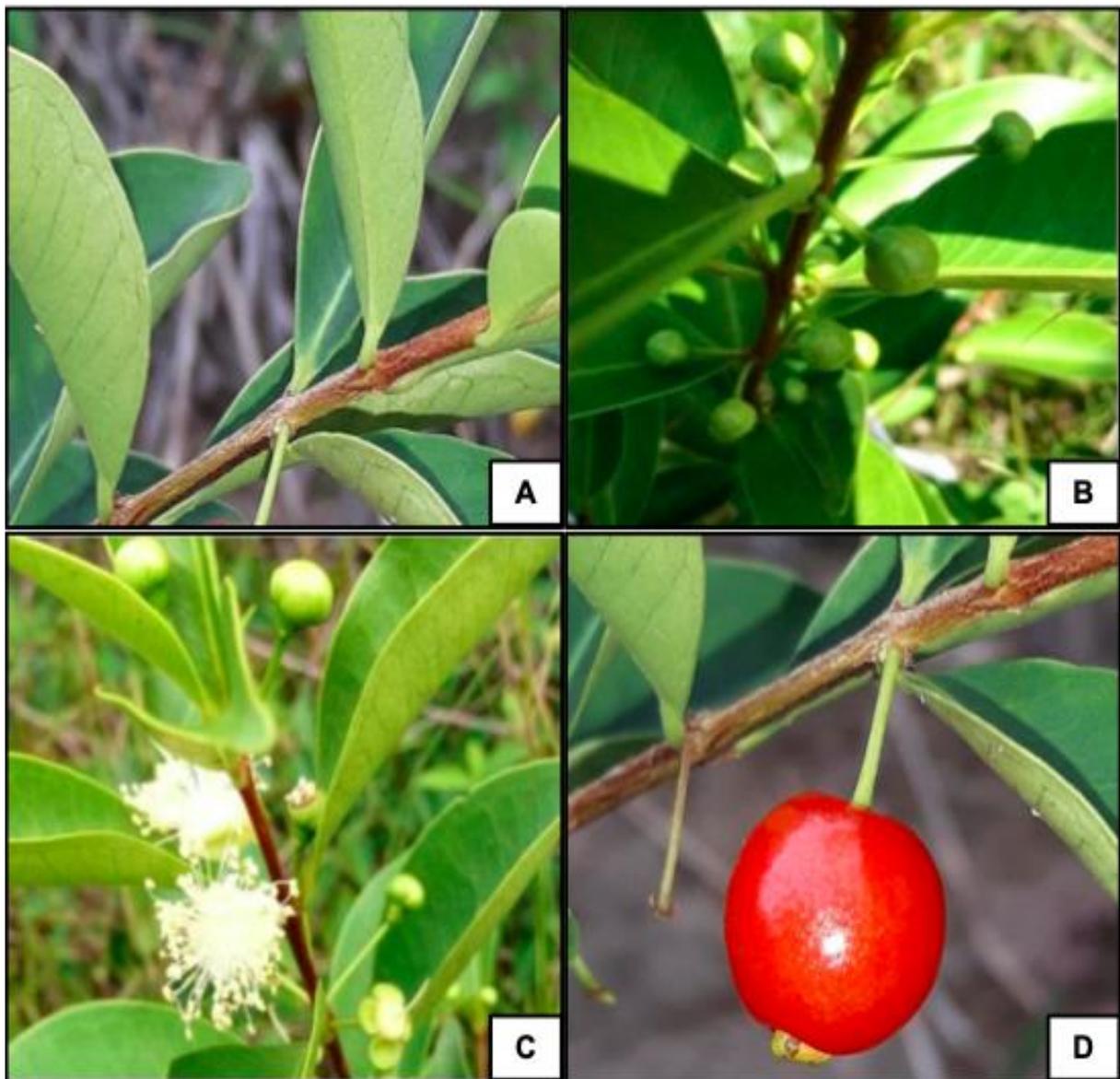


FIGURA 4. Partes da espécie *Eugenia punicifolia*: A-folhas, B-botão floral, C-flores e D-fruto. Fonte: FRANCO, 2018.

1.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são estabelecidos como misturas complexas de substâncias voláteis, constituídos de metabólitos secundários concentrados comumente nas folhas, cascas ou frutos de plantas aromáticas (VICTÓRIA et al., 2012).

Os óleos essenciais obtidos a partir de espécies do gênero *Eugenia* são caracterizados por sua diversidade química. Em geral, há uma predominância de compostos terpenóides (1,8-cineol, α -pineno, limoneno, α -copaeno, linalool, α -terpineol e β -cariofileno) (OLIVEIRA et. al., 2006; RAMOS et. al., 2010; ZATELLI, 2015; RIBEIRO, 2016; DA SILVA, 2017).

Tem sido crescente o interesse nessas amostras devido às múltiplas propriedades que apresentam (VICTORIA et al., 2012), tais como: antibacteriana (DIAO et al., 2014), antioxidante (XAVIER et. al., 2016), antiviral (KUBIÇA, 2012), alívio da dor e inflamação (GUILHON et al., 2011) e antitumoral (ARANHA, 2020). Vale salientar que os óleos essenciais são capazes de aumentar a eficácia de quimioterápicos comumente utilizados na clínica e também tem funções pró-ímmunes quando administrados a pacientes com câncer (BLOWMAN et. al., 2018).

Tendo isso em vista, este projeto teve como objetivo investigar a atividade antiproliferativa do óleo essencial EpNRP I isolado da espécie vegetal *Eugenia punicifolia*, Como não há estudos científicos publicados sobre o potencial de ação antitumoral desta espécie vegetal, pode-se dizer que os resultados obtidos por meio deste projeto são inéditos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação antiproliferativa *in vitro* do óleo essencial EpNRP I isolado da espécie vegetal *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antiproliferativa do óleo essencial EpNRP I em linhagens tumorais humanas de diferentes tecidos (glioma, mama, ovário resistente, próstata, ovário, cólon) e não tumoral (queratinócito humano);
- Avaliar a sua atividade anticlonogênica;
- Investigar o seu papel no ciclo celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

EpNRP I

O óleo essencial EpNRP I foi fornecido pelo Centro de Ciência e Tecnologia- (CCET), Departamento de Química, da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em colaboração com a Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha. A espécie foi coletada no Cerrado. Maranhense e a atividade de acesso ao patrimônio genético foi cadastrada no Sisgen (AD7DF67, Anexo). Foram retirados órgãos fungados ou com qualquer outro tipo de infecção, restando a espécie saudável e apta para extração de suas folhas.

O óleo essencial EpNRP I foi obtido pelo processo de hidrodestilação com água destilada em sistema composto por frasco de fundo redondo, aparelho de Clevenger modificado e condensador refrigerado por banho ultra-termostático, que mantinha a temperatura entre 10 e 15 ° C. Esse processo dura aproximadamente 3 horas, o óleo extraído em seguida foi centrifugado, totalmente separado da água e sua densidade foi calculada por meio da pesagem simples de uma amostra de 100 µL do mesmo. No início da extração, a umidade do material vegetal foi medida usando um analisador de umidade infravermelho (IV2500, GEHAKA), a uma taxa de secagem de 0,01% / minutos a 115 ° C por aproximadamente 30 minutos (FIGUEIREDO et al., 2019). Esta variável foi usada para determinar o valor do rendimento de extração a partir da seguinte equação, onde v e ρ são o volume e a densidade do óleo obtido e MFM é a massa livre de umidade do vegetal usado na extração.

$$\text{Rendimento\%} = (v_{\text{óleo}} \times \rho_{\text{óleo}}) / (\text{MFM}) \times 100$$

Após obtenção, o óleo essencial foi identificado e quimicamente caracterizado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).

3.2 CULTIVO CELULAR

3.2.1 Linhagens Celulares

O biomonitoramento do óleo essencial EpNRP I foi realizado através da avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* em painel de linhagens tumorais humanas comerciais adquiridas do *American Type Culture Collection* – ATCC (glioma, mama, ovário resistente, próstata, ovário,

cólon) e uma não tumoral (queratinócito).

3.2.2 Congelamento e descongelamento de células

Para a expansão das linhagens, as células foram cultivadas em frascos de 75 cm² (T75) e o volume final de suspensão celular congelado em soro fetal bovino (SFB) acrescido de 10% de dmsO em criotubos mantidos no nitrogênio foi de 1x10⁶ cels/mL.

O descongelamento das células foi realizado sempre que houve a necessidade de renovação ou obtenção de células em passagem adequada para os experimentos. Para tanto, os criotubos contendo as células foram descongelados à temperatura ambiente, seu conteúdo transferido para um tubo de centrífuga de 15 mL e o volume deste completado para 10 mL com meio de cultura RPMI-1640 contendo 5% de soro fetal bovino (SFB), 1% penicilina-estreptomicina (PS) e 1% de piruvato, para lavagem do DMSO utilizado no congelamento. A suspensão foi então transferida para frascos de manutenção de 25 cm² (T25) e incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

3.3 SCREENING IN VITRO

3.3.1 Experimento de atividade antiproliferativa

O ensaio colorimétrico de MTT - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium consiste em avaliar indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas (MOSMANN, 1983).

A suspensão celular foi preparada em meio RPMI-1640 contendo 5% de SFB e 1% de penicilina-streptomicina (PS) e ajustada em densidades de inoculação que foram previamente estabelecidas (Tabela 1). Foram inoculados 100 µL de suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Foi também preparada uma placa controle (placa T0), que continha todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

TABELA 1. Linhagens celulares utilizadas no ensaio antiproliferativo, com suas respectivas densidades de inoculação.

Sigla	Tipo histológico	Densidade de inoculação (10⁴ cels/mL)
U-251	Glioblastoma	3,0
MCF7	Adenocarcinoma de mama	6,0
NCI/ADR-RES	Adenocarcinoma de ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos	5,0
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	4,5
OVCAR-3	adenocarcinoma de ovário	5,0
HT-29	adenocarcinoma colorretal	6,0
HaCaT	Queratinócito não Tumoral	3,0

Após 24 horas, a amostra foi diluída em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. A amostra foi adicionada nas concentrações de 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, (100 µL/compartimento) em triplicata e, em seguida, incubadas por 48 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico cloridrato de doxorubicina (Eurofarma), nas concentrações de 0,16; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5 e 10 µg/mL (100 µL/compartimento), em triplicata.

As células inoculadas na placa controle T0 foram coradas com MTT para determinação da quantidade de células presentes no momento de adição das amostras, sendo este o valor basal 0. Após 48 horas de tratamento, as células tratadas foram então coradas com MTT e foram descontado o valor basal 0.

Os dados de absorvância foram analisados e compilados na elaboração de gráficos

relacionando a porcentagem de crescimento celular com a concentração da amostra. Através do software Origin®, foi feita a regressão linear das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento e foram calculados os valores de GI₅₀ (50% growth inhibition): concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular. Esses parâmetros foram utilizados para comparar a potência da amostra e evidenciar a seletividade da mesma.

Por meio deste ensaio foi determinada a linhagem celular MCF7, como a mais sensível, sendo selecionada para continuação dos estudos de atividade antiproliferativa.

3.4 EXPERIMENTO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (*CLONOGENIC ASSAY*)

Este ensaio investiga a capacidade do composto em inibir a replicação celular (RAFEHI et al., 2011). Primeiramente foi realizado o preparo do ágar base (1,2%), ágar topo (0,6%) e meio de cultura 2x contendo 20% SFB. Em seguida 5000 células foram semeadas em 1 mL de meio ágar base por poço em placas de 6 compartimentos que foram mantidas em estufa até o ágar endurecer. Posteriormente foi adicionado 1 mL de ágar topo sobre o ágar base e a placa foi novamente acondicionada na estufa por 24h.

Após 24h, o ágar foi solidificado e então 500 µL de amostra diluída em meio foram adicionados nos poços, sendo trocados a cada 3 dias, por um período de 21 dias, sempre observando a formação de colônias e se o ágar foi hidratado.

Após 21 dias em cultura, as colônias foram lavadas com 500 µL de PBS e fixadas e coradas com 2 mL de uma solução contendo formaldeído 0,005% e cristal violeta, por 15 min. Em seguida o corante foi removido e as colônias foram lavadas com água, sendo posteriormente as placas invertidas para secarem sobre um papel absorvente. Os poços foram fotografados e as imagens foram analisadas no software Image J, para quantificação das colônias.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM FASES DO CICLO CELULAR

A investigação da ação do EpNRP I no processo de divisão celular foi realizado no citômetro de fluxo Guava Easy Cyte 5HT Benchtop Flow Cytometer, Millipore®, Billerica, MA, EUA. A concentração do composto escolhida para avaliação foi baseada no ensaio de MTT, levando-se em conta o valor de GI₅₀ e a linhagem tumoral de mama MCF7 foi selecionada de acordo com a sensibilidade à amostra. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra.

Esse ensaio baseia-se na diferenciação de células nos diversos estágios do ciclo celular pela marcação do DNA com iodeto de propídio (PI), um intercalante de DNA. Essa análise só é permitida após a permeabilização da membrana com o etanol 70% à 4°C.

Após 24 horas da inoculação celular conforme descrito acima, o SFB foi retirado do meio para o carenciamento, ou seja, a sincronização das células para o início do ciclo celular. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico etoposídeo, na concentração de 10 μM , que causa parada do ciclo em S ou G2/M (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2013). Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, lavadas com PBS e fixadas com etanol 70% por no mínimo 12 horas antes do processo de marcação. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas com 200 μL do reagente Guava Cell cycle, sendo incubadas por 30 minutos protegidas da luz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie vegetal *Eugenia puniceifolia* tem sido bastante estudada quanto às suas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva (COSTA et. al., 2016; SRINIVASULU et al., 2018), mas não apresenta descrições científicas sobre sua atividade antiproliferativa, portanto, deve ser melhor explorada.

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL EpNRP I

A composição do óleo essencial EpNRP I é majoritariamente de monoterpenos, sendo o constituinte principal o α -pineno (~ 50%), seguido de 1,8-cineol (~ 14%) e α -terpineol (~ 7%) em concentrações significativas (Tabela 2).

Quimicamente, em sua maioria, os óleos essenciais são constituídos de substâncias terpenos, com perfil normalmente composto de moléculas de dez a quinze carbonos (monoterpenos e sesquiterpenos). Os terpenos são compostos originados do metabolismo secundário de vegetais, assim como flavonóides e taninos, os quais são responsáveis pela atividade biológica da planta. Relatos científicos ratificam o potencial farmacológico de terpenos presentes em extratos vegetais, demonstrando possíveis efeitos desses compostos sobre os mediadores químicos da inflamação (RIBEIRO, 2020; DE ALBUQUERQUE, 2020).

Existem dados na literatura que afirmam que o co-tratamento de α -pineno com paclitaxel pode exercer citotoxicidade em câncer de pulmão com redução dos efeitos adversos graves, por minimizar a dose quimioterapêutica sem comprometer a eficácia antitumoral (ZHANG et al., 2014). Outro estudo demonstrou que α -pineno é eficaz em inibir o crescimento de câncer de próstata, por induzir apoptose, tendo grande potencial para ser desenvolvido como um novo agente terapêutico para o tratamento dessa patologia (ZHAO ET AL., 2017). Assim como α -pineno, os demais compostos 1,8-cineol e α -terpineol apresentam atividade anticâncer comprovada (AMARAL, 2014).

TABELA 2. Rendimento e composição do óleo essencial EpNRP I.

Tempo de retenção	Substância	EpNRP I (%)
3.115	hexanal	-
5.585	α -pineno	49.75
5.910	α -fenqueno	0.11
5.960	canfeno	0.60
6.725	β -pineno	1.55
7.120	mirceno	-
8.190	p-mirceno	0.44
8.315	limoneno	5.08
8.435	1,8-cineol	13.77
8.615	(Z)- β -ocimeno	-
8.955	(E)- β -ocimeno	-
11.510	fenchol	0.75
13.635	borneol	2.28
14.680	α -terpineol	7.32
19.310	trans-pinocarvil acetato	-
20.760	δ -elemeno	-
22.365	α -ilangeno	0.47
23.055	β -elemeno	-
24.170	(E)-cariofileno	4.27
24.575	β -elemeno	-

Continuação

TABELA 2. Rendimento e composição do óleo essencial EpNRP I.

Tempo de retenção	Substância	EpNRP I (%)
24.750	γ -elemeno	-
25.570	α -humuleno	0.64
26.205	4,5-di-epi-aristoloqueno	2.31
26.680	germacreno D	-
26.885	β -selineno	1.00
27.290	guaia-1.11-dieno	1.97
27.310	biciclogermacreno	-
28.135	7-epi- α -selineno	0.49
28.365	δ -cadineno	-
29.685	germacreno B	-
30.560	β -atlantol	-
30.745	óxido de cariofileno	-
30.810	aromadendreno	-

Continuação

TABELA 2. Rendimento e composição do óleo essencial EpNRP

Tempo de retenção	Substância	EpNRP I (%)
	Aldeídos	-
	Monoterpenos hidrocarbonos	57.53
	Monoterpenos oxigenados	24.12
	Sesquiterpeno hidrocarbono	11.15
	Sesquiterpeno oxigenado	-
	TOTAL	92.80
	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO	0.84

4.2 EXPERIMENTO DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

O resultado do ensaio de atividade antiproliferativa foi reportado como GI_{50} (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento celular), em $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3). Valores de $GI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ foram considerados baixos e foram consideradas sensíveis as linhagens que apresentaram $GI_{50} < 8 \mu\text{g/mL}$. O óleo essencial EpNRP I (Figura 4) demonstrou baixos valores de GI_{50} para 5 linhagens tumorais analisadas, sendo U-251 (glioblastoma) e MCF7 (mama) as linhagens que apresentaram mais sensibilidade ao tratamento, com valores de GI_{50} de 2,13 e 6,72 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 3). Além disso, EpNRP I apresentou efeitos citotóxicos para a linhagem não tumoral de queratinócitos HaCaT, porém, o seu efeito foi 46 vezes menor se comparado com o controle positivo do ensaio, o quimioterápico cloridrato de doxorrubicina (Figura 5).

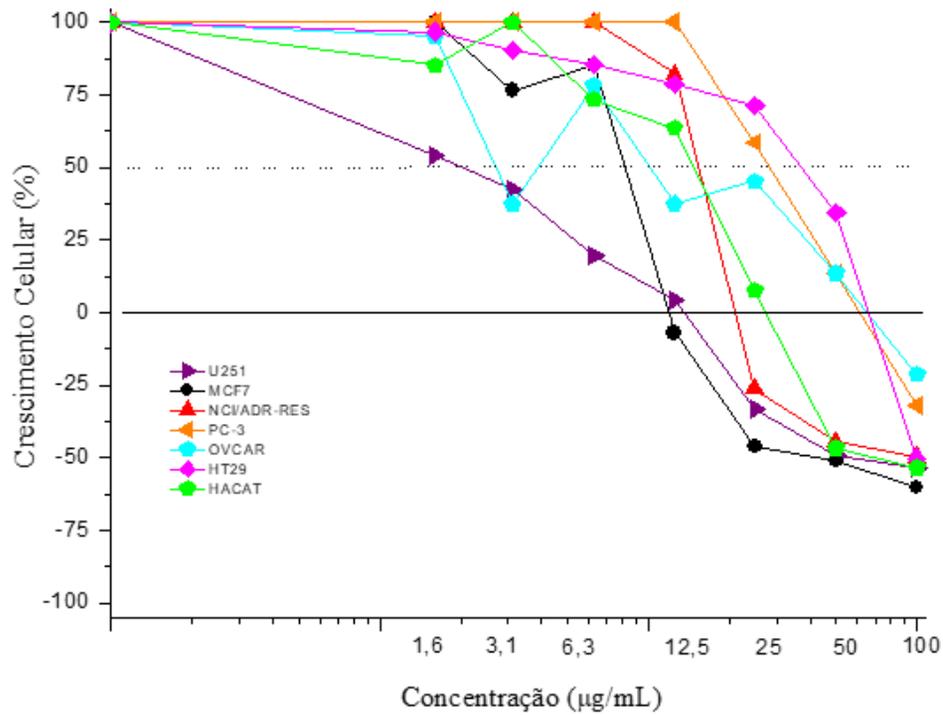


FIGURA 5. Gráfico da atividade antiproliferativa do composto EpNRP I. Ensaio realizado em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração, após 48h de incubação. U-251 - glioblastoma; MCF7 - adenocarcinoma de mama; NCI/ADR-RES – ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; PC-3 – adenocarcinoma de próstata; OVCAR-3 – adenocarcinoma de ovário; HT29 - adenocarcinoma colorretal; HaCat - linhagem não-tumoral de queratinócitos.

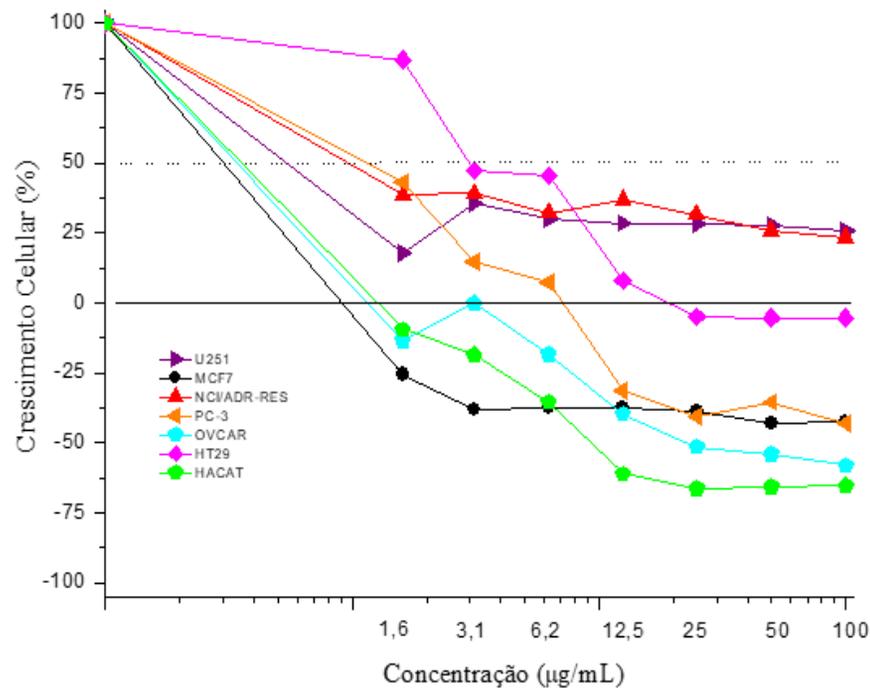


FIGURA 6. Gráfico da atividade antiproliferativa do quimioterápico cloridrato de doxorrubicina. Ensaio realizado em cultura de células tumorais humanas, relacionando porcentagem de crescimento versus concentração, após 48h de incubação. U-251 - glioblastoma; MCF7 - adenocarcinoma de mama; NCI/ADR-RES - adenocarcinoma de ovário resistente a múltiplos fármacos; PC-3 - adenocarcinoma de próstata; OVCAR-3 - adenocarcinoma de ovário; HT29 - adenocarcinoma colorretal; HaCat - linhagem não-tumoral de queratinócitos.

TABELA 3. Valores de GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) após 48h de tratamento.

GI_{50}	U-251	MCF7	NCI/ADR-RES	PC-3	OVCAR-3	HT29	HaCaT
EpNRP I	2,13	6,72	13,23	27,61	8,51	33,09	13,35
CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA	1,20	0,18	2,27	1,46	0,22	3,90	0,31

U-251 - glioblastoma; MCF7 - adenocarcinoma de mama; NCI/ADR-RES - ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; PC-3 - adenocarcinoma de próstata; OVCAR-3 - adenocarcinoma de ovário; HT29 - adenocarcinoma colorretal; HaCat - linhagem não-tumoral de queratinócitos.

Considerando o baixo valor de GI_{50} que o EpNRP I obteve para a linhagem de mama MCF7 aliado ao fato de este tipo tumoral ser o que mais acomete as mulheres brasileiras e os tratamentos existentes conferirem tantos efeitos adversos às pacientes, esta linhagem foi selecionada para dar continuidade à investigação da atividade antiproliferativa do EpNRP I. Embora o foco do estudo tenha sido a investigação da atividade antiproliferativa do óleo essencial em linhagem tumoral de mama, o resultado obtido para a linhagem de glioblastoma é bastante interessante. Devido à presença de barreira hematoencefálica, a implementação de novas abordagens para o tratamento de glioblastoma é muito mais difícil do que no caso de outros tumores. A seletividade desta barreira reduz a biodisponibilidade de drogas hidrofílicas no sistema nervoso central. Acredita-se que os constituintes voláteis dos óleos essenciais cruzem facilmente a barreira hematoencefálica devido ao seu pequeno tamanho molecular e natureza lipofílica (AYAZ et al., 2015). Portanto, incentivamos a continuidade dos estudos com a linhagem U251.

4.3 EXPERIMENTO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (*CLONOGENIC ASSAY*)

Através do ensaio de formação de colônias analisou-se a capacidade da amostra em inibir o potencial clonogênico desta linhagem tumoral. Como observado na Figura 6, fica claramente explícita a capacidade do óleo essencial EpNRP I em inibir a replicação da linhagem, uma vez que o número de colônias formadas no tratamento com o controle DMSO (A) foi estatisticamente maior do que número de colônias formadas com o tratamento com EpNRP I (B). Conforme apresentado na Figura 7, houve uma redução de 63% no número de colônias de células após o tratamento com EpNRP I.

Este ensaio mensura o potencial das células em se expandir em colônias, refletindo a capacidade de metastização de células, um passo-chave da progressão tumoral. Uma maneira de resolver esse problema seria inibir efetivamente vias de sinalização que controlam a replicação celular (HANAHAN & WEINBERG, 2011). O resultado aqui relatado corrobora os resultados obtidos por meio do ensaio MTT e destaca a potencial atividade anticlonogênica de EpNRP I.

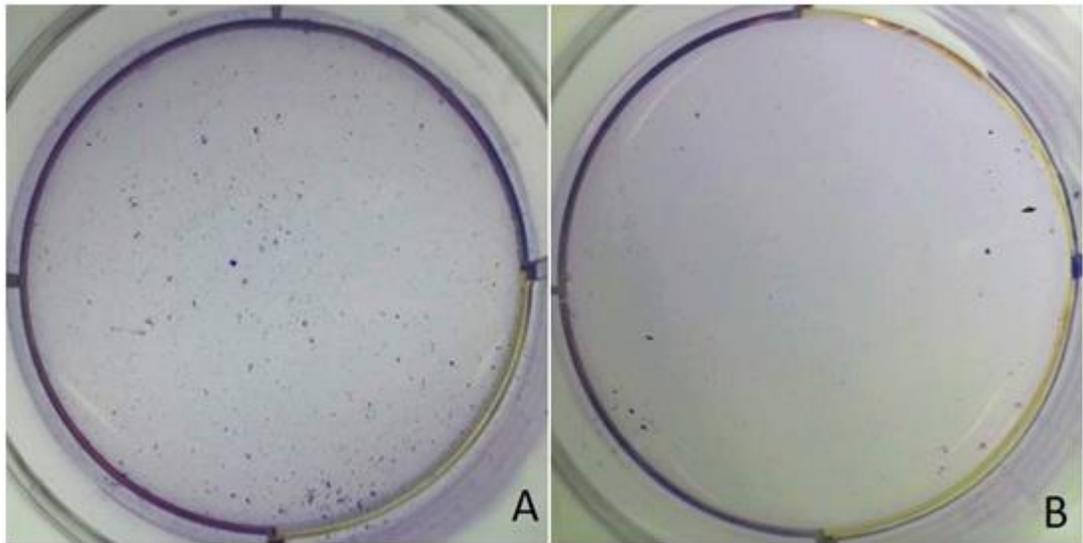


FIGURA 7. Colônias MCF7 formadas após tratamento com DMSO (A) e EpNRP I (B) na concentração de 7 μg /21 dias.

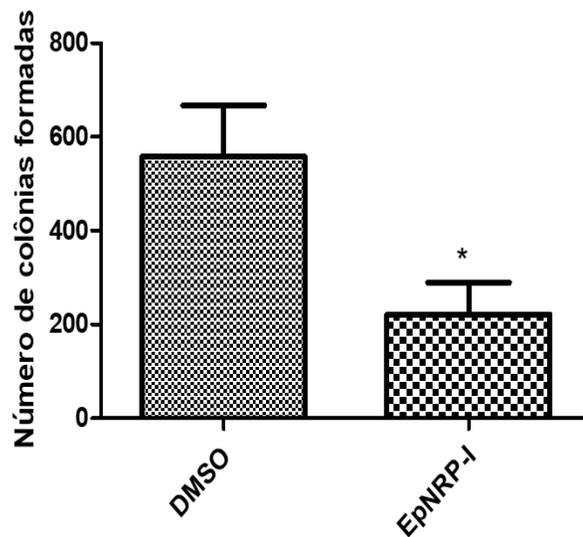


FIGURA 8. Número de colônias formadas após 21 dias de tratamento. Teste t, * $p < 0.01$.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM FASE DO CICLO CELULAR

Por citometria de fluxo foi possível observar, após 24 horas, que houve um aumento do número de células na fase S tratadas com etoposídeo (de 9,3% para 26,7%) e EpNRP I (de 9,3% para 20,0%), com conseqüente redução de células na fase G1 (de 87,5% para 71,8%, para

etoposídeo e 87,5% para 78,05% para EpNRP I) quando comparadas ao controle de células tratadas com DMSO (Figura 8), o que pode indicar que a amostra induz a parada do ciclo celular na fase de duplicação do material genético das células desta linhagem. Além disso, analisando-se etoposídeo e o óleo essencial, os valores resultantes em fase S são parecidos, podendo sugerir que a amostra possa ter um efeito na topoisomerase II como é o mecanismo de ação descrito para o etoposídeo (BALDWIN & OSHEROFF, 2005). Esta enzima nuclear controla e modifica o estado topológico do DNA, participando do processo de deslicoidização do DNA, importante evento para que a replicação do material genético e, portanto, a divisão celular, possam ocorrer. Assim, as topoisomerasas são alvos importantes no desenvolvimento de novas drogas, principalmente para as que apresentam atividade antitumoral (BRANCO et al, 2008). Futuras investigações sobre o mecanismo de ação deste óleo essencial sobre esta importante enzima no processo de replicação celular devem ser conduzidas.

Assim, algumas características marcantes do câncer como proliferação descontrolada e perda do controle do ciclo celular, devido a alterações no controle genético da divisão celular, são muito importantes para o entendimento e descoberta de novos fármacos que atuem efetivamente contra esta patologia. Assim, numerosas estratégias terapêuticas têm como alvo algumas fases do ciclo celular (DOMINGUEZ-BRAUER et al., 2015).

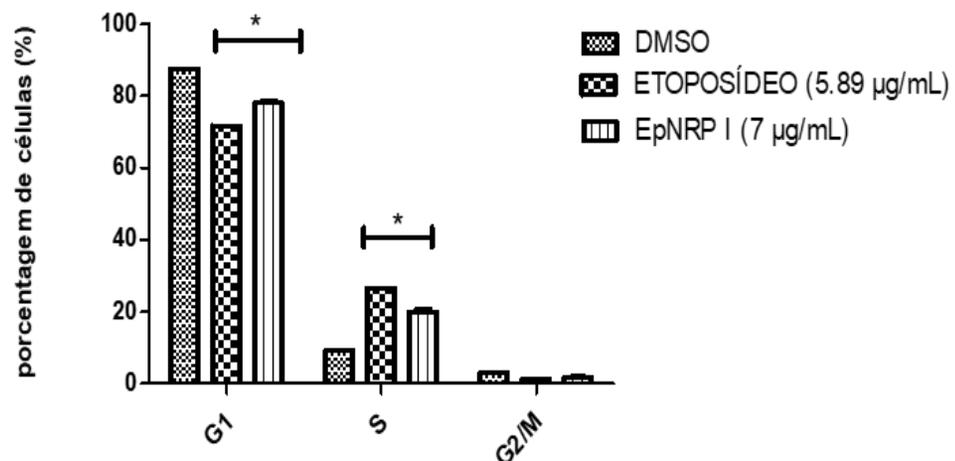


FIGURA 9. Quantificação de células MCF7 (mama) após 24 horas de tratamento com veículo (DMSO), etoposídeo (10 µM = 5.89 ug/mL) e EpNRP I (7 µg/mL). *p<0.001 Anova seguida de pós-teste Bonferroni.

5. CONCLUSÃO

O óleo essencial EpNRP I demonstrou potente atividade antiproliferativa e anticlonogênica na linhagem tumoral de mama (MCF7). A investigação preliminar acerca do seu mecanismo de ação aponta para uma parada do ciclo celular na fase S, assim como o quimioterápico etoposídeo, utilizado na clínica. Considerando que etoposídeo atua inibindo a enzima topoisomerase II, futuras investigações sobre o mecanismo de ação deste óleo essencial sobre esta importante enzima no processo de replicação celular devem ser conduzidas. Além do mais, tendo em vista a potencial ação de reversão do mecanismo de resistência a múltiplos fármacos que produtos naturais têm demonstrado possuir, estudos de combinação com quimioterápicos devem ser realizados para investigar o potencial de ação adjuvante de EpNRP I no tratamento antitumoral.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. L.; ANDREI, L.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALVARENGA, E. C.; CAIRES, A.; LADEIRA, L. O.; GAMERO, E. J. P.; PAZ, M. M.; LEITE, M. D. F. Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 43-48, 2014.

ANDRADE, C. C. N. D. **Produtos naturais contra o câncer de pâncreas: uma atualização de 2000 a 2018**. 2018. 76 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa- PB.

ANDRADE, L. N.; AMARAL, R. G.; SANTOS, S. A.; SANTOS, E. W. P. D.; LIMA, F. D. C.; BARBOSA, T. C.; SEVERINO, P.; CARVALHO, A. A. **Contribuição dos produtos naturais para o desenvolvimento de tratamentos para o câncer**. Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE, v. 5, n. 2, p. 119, 2019.

ANGELINI, P.; TIRILLINI, B.; AKHTAR, M. S.; DIMITRIU, L.; BRICCHI, E.; BERTUZZI, G.; VENANZONI R. Essencial Oil with Anticancer Activity: An Overview. In: **Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements**. Springer, Singapore, 2018. p. 207-231.

ARAÚJO, L. P. D.; SÁ, N. M. D.; ATTY, A. T. D. M. Necessidades Atuais de Radioterapia no SUS e Estimativas para o Ano de 2030. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 62, n. 1, p. 35-42, 2016.

ARANHA, E. S. P. **Avaliação do potencial anticâncer in vitro de óleos essenciais de plantas do gênero Eugenia**. 2014. 82 f. Dissertação (Pós graduação em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Amazonas. Manaus- MA, 2014.

ARANHA, E. S. P. **Efeito antitumoral de 22β-hidroxitengenona obtida de Salacia impressifolia (Miers) AC (Celastraceae) contra células de melanoma humano**. 2020. 83 f. Tese de doutorado (Pós graduação em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus – AM, 2020.

AYAZ, M.; JUNAID, M.; ULLAH, F.; SADIQ, A.; KHAN, M. A.; AHMAD, W.; SHAH, M. R.; IMRAN, M.; AHMAD, S. Comparative chemical profiling, cholinesterase inhibitions and anti-

radicals properties of essential oils from *Polygonum hydropiper* L: A Preliminary anti-Alzheimer's study. **Lipids in health and disease**, v. 141, n. 14, p. 1-12, 2015.

BALDWIN, E. L; OSHEROFF, N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 4, p. 363-372, 2005.

BASTING, R. T. **Avaliação da atividade antiinflamatória e antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC.** 2012. 101 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu-SP.

BIGOLIN, A. **Investigação do Mecanismo de Morte Celular Induzido Por Compostos em Células e Linhagens de Neoplasias Hematológicas.** 2016. 146 f. Dissertação (Pós graduação em Farmácia)- Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis- SC, 2016.

BLOWMAN, K.; MAGALHÃES, M.; LEMOS, M. F. L.; CABRAL, C.; PIRES, I. M. Anticancer properties of essential oils and other natural products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRANCO, A.; PINTO, A. C.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, E. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Rubrofusarina, um policetídeo natural inibidor da topoisomerase II- α humana. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 18, p.703-708, 2008.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BISHAYEE, A.; SETHI, G. Bioactive natural products in cancerprevention and therapy: Progress and promise. In: **Seminars in cancerbiology**, v. 40, p. 1-3, 2016.

CALIARI, C. P. **Estudos em Myrtaceae do estado de São Paulo: *Myrcia* seção Gomidesia.** 2013. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP. 2013.

COSTA, M. F.; JESUS, T. I.; LOPES, B. R. P.; ANGOLINI, C. F. F.; MONTAGNOLLI, A.; GOMES, L. D. P.; PEREIRA, G. S.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, C. D.; TOLEDO, K. A. *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 403, 2016.

DAMETTO, A. C.; AGUSTONI, D.; MOREIRA, T. F.; PLAZA, C. V.; PRIETO, A. M.; SILVA, T. G. A.; SOUZA, F. O.; BORALLE, N.; SORBO, J. M.; SILVA, D. H. S.; SOARES, C. P. Chemical composition and in vitro chemoprevention assessment of *Eugenia jambolana* Lam.(Myrtaceae) fruits and leaves. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 490-502, 2017.

DA SILVA, M. A. B.; MIRANDA, M. M. D. A.; CARVALHO, D. D. A.; FERNANDES, H. M. B.; FILHO, A. A. D. O. Bioprospecção dos potenciais farmacológicos do monoterpene 7-hidroxicitronelal: Ensaios in silico. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 7, n. 2, p. 72-76, 2017.

DE ALBUQUERQUE, Y. A. P. **Potencial Remediador do Extrato das Folhas de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC.(Myrtaceae) sobre o desenvolvimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. expostas ao sulfato de níquel.** 2020. 85 f. Dissertação (Pós graduação em Produção Vegetal)-Universidade Federal Rural de Pernambuco. Serra Talhada- PE, 2020.

DEVITA, V. T; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer research**, v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 2008.

DIAO, W. R.; HU, Q. P.; ZHANG, H.; XU, J. G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food control**, v. 35, n. 1, p. 109-116, 2014.

DOMINGUEZ-BRAUER, C.; THU, K. L.; MASON, J. M.; BLASER, H; BRAY, M. R.; MAK, T. W. Targeting mitosis in cancer: emerging strategies. **Molecular cell**, v. 60, n. 4, p. 524-536, 2015.

DURIGAN, G. Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo, **Páginas & Letras Editora e Gráfica**, 2004. 475 p.

FIGUEIREDO, P. L. B.; PINTO, L. C.; COSTA, J. S. D.; SILVA, A. R. C. D.; MOURÃO, R. H. V.; MONTENEGRO, R. C.; SILVA, J. K. R. da; MAIA, J. G. S. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 232, p. 30–38, 2019.

FRANCO, D. D. C. **Estudo circadiano do óleo essencial da espécie *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. do Município de Ilha Grande do Piauí.** 2018. 55 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura em Química) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. Parnaíba- PI.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; MA, H.; EDMONDS, M. E; SEERAM, N. P. Maple polyphenols, ginnalins A–C, induce S-and G2/M-cell cycle arrest in colon and breast cancer cells mediated by decreasing cyclins A and D1 levels. **Food chemistry**, v. 136, n. 2, p. 636-642, 2013.

GUERRA, M. R.; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T.; CORRÊA, C. S. L.; ABREU, D. M. X. D.; CURADO, M. P.; MOONEY, M.; NAGHAVI, M.; TEIXEIRA, R.; FRANÇA, E. B.; MALTA, D. C. Magnitude e variação da carga da mortalidade por câncer no Brasil e Unidades da Federação, 1990 e 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, p. 102-115, 2017.

GUILHON, C. C; RAYMUNDO, L.J.R.P.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATHEUS, M. E.; CAVALCANTI, S. C.H.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 406-413, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: thenextgeneration. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

INCA. Incidência do Câncer no Brasil. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em 10/09/2019.

INCA. Registros de Câncer. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer/registros-de-cancer>>. Acesso em: 10/07/2020.

KUBIÇA, T. F. **Atividade antiviral de óleos essenciais e monoterpenos contra vírus de bovinos e felinos como potenciais modelos para vírus humanos.** 2012. 90 f. Dissertação (mestrado-Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS. 2012.

LEITE, I. A.; MARINHO, M. D. G. V. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em comunidade indígena no município de Baía da Traição-PB. **Biodiversidade**, v. 13, n. 1, 2014.

MARTINS, A. S. **Vida e Morte nos Carcinomas Mamários Caninos: Estudo Imunohistoquímico da Atividade Proliferativa e Apoptose.** 2014. 30 f. Relatório Final (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade do Porto. Porto –PT, 2014.

MONDAL, S.; BANDYOPADHYAY, S.; GHOSH, M. K.; MUKHOPADHYAY, S.; ROY, S.; MANDAL, C. Natural products: promising resources for cancer drug discovery. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 12, n. 1, p. 49-75, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. A Tale of Two Tumor Targets: Topoisomerase I and Tubulin. The Wall and Wani Contribution to Cancer Chemotherapy. **Journal of natural products**, v.67, n. 2, p. 232-244, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D. T.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

OLIVEIRA, A. M.; HUMBERTO, M. M. D. S.; SILVA, J. M. D.; ROCHA, R. D. F. D. A.; SANTÁNA, A. E. G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 16, p. 618-624, 2006.

PENATTI, V. S. **Imunoterapia no câncer de mama.** 2019. 24 f. Trabalho de conclusão de curso em ciências da saúde- Centro Universitário UNIFACIG. Manhuaçu- MG.

PRAKASH, O. M.; KUMAR, A.; KUMAR, P. Anticancer potential of plants and natural products. **Am. J. Pharmacol. Sci.**, v. 1, p. 104-115, 2013.

RAMOS, M. F. D. S., MONTEIRO, S. D. S., DA SILVA, V. P., NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Essential oils from Myrtaceae species of the Brazilian Southeastern maritime forest (Restinga). **Journal of Essential Oil Research**, v.22, n.2, p. 109-113, 2010.

RAFEHI, H.; ORLOWSKI, C., GEORGIADIS, G. T.; VERVERIS, K.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. C. Clonogenic Assay: Adherent Cells. **Journal of Visualized Experiments**, v. 49, 2011.

RAJESH, E.; SANKARI, L. S.; MALATHI, L. KRUPAA, J. R. Naturally Occurring Products in Cancer Therapy. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 181 – 183, 2015.

RIBEIRO, A. B. B. G. et al. Avaliação in silico da atividade anti-inflamatória do monoterpreno Ascaridol. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, 2020.

RIBEIRO, E. C. G. **Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região Amazônica maranhense**. 2016. 89 f. Dissertação (pós graduação em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão. São Luís -MA. 2016.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. D. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 3, p. 529-548, 2006.

SANTOS, T. S. **Bioprospecção da peçonha bruta de *Odontomachus chelifer* (FOWLER, 1980): um estudo parcial sobre suas ações funcionais**. 2019. 42 f. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia-MG.

SILVA, B. A. O. D. **Citotoxicidade de complexos de Paládio (II) para as linhagens MCF-7 e MDA-MB-435 de adenocarcinoma mamário humano**. 2019. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas) - Universidade Federal de Alfenas. Alfenas-MG, 2019.

SILVA-NETA, M. D. N. **Influência dos ácidos hidroxicinâmicos na proliferação e ciclo celular do câncer de pulmão: uma revisão**. 2017. 41 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande. Cuité-PB.

SRINIVASULU, C.; RAMGOPAL, M.; RAMANJANEYULU, G.; ANARADHA, C. M.; SURESH, K. C. A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 547-557, 2018.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P. D.; MOTTA, A. D. S. D.; NASCENTE, P. D. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.

XAVIER, M. N.; ALVES, J.M.; CARNEIRO, N.S.; SOUCHIE, E.L.; SILVA, E.A.J.; MARTINS, C.H.G.; AMBROSIO, M.A.L.V.; EGEA, M.B.; ALVES, C.C.F.; MIRANDA, M.L.D. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl.(Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p.1433-1448, 2016.

YUAN, R.; HOU, Y.; SUN, W.; YU, J.; LIU, X.; NIU, Y.; LU, J.; CHEN, X. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. **Annals of the new York Academy of Sciences**, v. 1401, n. 1, p. 19-27, 2017.

ZATELLI, G. A. **Investigação fitoquímica e biológica de *Eugenia hiemalis* Cambessèdes (Myrtaceae)**. 2015. 217 f. Dissertação (Pós graduação em Farmacia) - Universidade de Santa Catarina. Florianópolis- SC. 2015.

ZHANG, Z.; GUO, S.; LIU, X.; GAO, X. Synergistic Antitumor Effect of α -pinene and β -pinene with Paclitaxel against Non-small-cell Lung Carcinoma (NSCLC). **Drug Research**, v. 65(4), p. 214–218, 2014.

ZHAO, Y.; CHEN, R.; WANG, Y; YANG Y. α -Pinene Inhibits Human Prostate Cancer Growth in a Mouse Xenograft Model. **Chemotherapy**, v. 63, n.1, p. 1–7, 2017.

7. ANEXO - CADASTRO NO SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº AD7DF67

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AD7DF67**
 Usuário: **UFMA**
 CPF/CNPJ: **06.279.103/0001-19**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Eugenia punicifolia

Título da Atividade: **Estudo Químico e Avaliação biofarmacológica de Eugenia punicifolia**

Equipe

Cláudia Quintino da Rocha	UFMA
YAN MICHEL LOPES FERNANDES	UFMA
GIOVANNA BARBARINE LONGATO	USF
Odair dos Santos Monteiro	UFMA

Parceiras Nacionais

33.495.870/0001-38 / Casa de Nossa Senhora da Paz - Ação Social Franciscana

Data do Cadastro: **28/05/2019 16:18:19**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 16:19 de 28/05/2019.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**