Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Nemes Veiga Pacheco Silva

Avaliação da atividade antineoplásica e anti – inflamatória do óleo essencial e do extrato etanólico de *Myrciaria glomerata* O. Berg

Rio de Janeiro
2019

Nemes Veiga Pacheco Silva

Avaliação da atividade antineoplásica e anti – inflamatória do óleo essencial e do extrato etanólico de *Myrciaria glomerata* O. Berg

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora Prof.ª Dra. Maria da Graça Justo Araújo

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

S586 Silva, Nemes Veiga Pacheco.
Avaliação da atividade antineoplásica e anti – inflamatória do óleo essencial e do extrato etanólico de *Myrciaria glomerata* O. Berg / Nemes Veiga Pacheco Silva. - 2019.
94 f. ; il.

Orientação: Maria da Graça Justo Araújo
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal.

1. Plantas medicinais – Uso terapêutico - Teses. 2. Óleos essenciais - Teses. I. Araujo, Maria da Graça Justo.. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. IV. Título.

CDU 633.88

Rinaldo C. Magallon CRB-7/5016 - Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Nemes Veiga Pacheco Silva

Avaliação da atividade antineoplásica e anti – inflamatória do óleo essencial e do extrato etanólico de *Myrciaria glomerata* O. Berg

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de novembro de 2019.

Orientadora: Prof.ª Dra. Maria da Graça Justo Araújo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.ª Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Daniele Corrêa Fernandes

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Helena Regina Pinto Lima

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira (suplente)

Fundação Oswaldo Cruz

_____

Prof.ª Dra. Patricia Alves Reis (suplente)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

À Jeová Deus, que por meio de seu filho Jesus Cristo, tem me fortalecido em toda minha trajetória acadêmica desde a graduação até o presente momento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me fez conhecê-lo em todos os momentos de adversidade, mostrou-me que nunca estou só, aprendi que quando me sinto fraca aí é que de fato sou forte porque nesse momento Ele me carrega em seus braços e me conduz por um caminho de vitória ... Senhor Deus tu és tudo pra mim sem Ti não sei viver, és a luz do meu olhar a fonte em meu ser...

A minha mãe Jurema, por todo seu amor, companheirismo, dedicação e ensinamentos, meu pai Celso, (*in memoriam*), por sempre acreditar na minha capacidade, à meus irmãos Junior, Bianca, Nívia e meus sobrinhos Willian, Ricardo Jr, Nubya, Celso Neto, Sophia e Ester que demonstraram sempre seu carinho e orgulho.

A meu marido Hélio, por cuidar de mim com tanto afinco, e filhos Nemes Ohana, Fernanda e Richard os quais amo incondicionalmente não somente por saberem compreender os momentos de adversidade que enfrentamos juntos para tornar possível o sonho, mas também por todo amor que eu recebo.

Aos amigos queridos que contribuíram de alguma forma na realização deste estudo, Verinha, Nilda, Eduardo Fonseca, Tatiana, Marcinho, Paulinho, Shyrlei, Betinho, Lorena, Mirela, Thayssa, Thayane, Thiago, Rachell, Raquel, Felipe, Daniele, Bruna, João Roberto e as meninas do “Cruzy” Carol Machado, Carol Vieira, Jéssica Isis e Amanda.

Aos brilhantes Profº Flavio José da Silva Dantas, do departamento de Biofísica, e as Profª Marsen Coelho, Profª Katia Sabino, Profª Marcia Paes e Profª Graça Justo do departamento de Bioquímica que me acolheram muito carinhosamente neste departamento.

E finalmente agradeço a UERJ, por ter me acolhido como aluna desde a graduação em Ciências Biológicas e por me permitir alçar voos ainda mais altos. Estou ciente de que esta etapa é apenas o início de uma longa jornada em minha trajetória acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.

Paulo Freire

RESUMO

SILVA, Nemes Veiga Pacheco. **Avaliação da atividade antineoplásica e anti – inflamatória do óleo essencial e do extrato etanólico de *Myrciaria glomerata* O. Berg**. 2019. 89 f Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Myrciaria glomerata O. Berg, popularmente conhecida como "cabeludinha", possui ácido ascórbico e propriedades antimicrobiana e antifúngica comprovadas. Os objetivos deste trabalho envolveram o estudo *in vitro* da atividade antineoplásica e anti-inflamatória, do Óleo Essencial (OE) e Extrato Etanólico (EE), extraídos de folhas de *M. glomerata*, coletadas na Floresta da Tijuca no Rio de Janeiro. A extração do OE foi realizada partindo-se da biomassa fresca acondicionada em aparelho tipo *Clevenger*, enquanto o EE foi obtido por maceração exaustiva com etanol, filtração e evaporação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com rendimentos de 0,17% (OE) e 7,67% (EE), ambos em relação à biomassa fresca. O estudo fitoquímico dos materiais de *M. glomerata* foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). A atividade antineoplásica *in vitro* do OE e EE foi investigada através dos ensaios de MTT e exclusão por azul de tripan sobre linhagens leucêmicas (Jurkat e K562) e tumorais (MCF-7, PC3 e A549), e células sadias VERO. Seus efeitos sobre o ciclo celular e apoptose foram estudados com a linhagem Jurkat, que se mostrou a mais sensível. A ação anti-inflamatória foi avaliada sobre a linhagem macrofágica RAW 264.7, através da produção de Óxido Nítrico (NO), pelo ensaio de Griess, e da migração celular, pelos métodos de *Wound healing e Boyding*, em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS *in vitro*. O OE, nas concentrações de 50 e 100 µg/ml, reduziram, respectivamente, a viabilidade das linhagens K562 (11,24% e 11,77%), PC3 (15,65% e 25,21%), MCF7 (13% e 27,8%) e Jurkat (14,84% e 28,31%). O EE (50 e 100 µg/ml) reduziu, respectivamente, a viabilidade das linhagens K562 (11,42% e 15,74%), PC3 (21% e 21%), MCF7 (26,7% e 34,5%), Jurkat (16,5% e 77,6%), e A549 (20,0%) somente em 100 µg/ml. Os resultados obtidos com *M. glomerata* mostraram que os produtos extraídos apresentaram efeito antineoplásico inédito, principalmente pelo EE sobre as linhagens Jurkat (IC_{50} = 68,34 µg/ml), tanto citostático quanto citotóxico, observados pela diminuição da proliferação de forma dose dependente, e pelo aumento de apoptose nas concentrações de 100 e 200 µg/ml respectivamente, sem apresentar citotoxicidade para a linhagem VERO. Ambos os produtos de *M. glomerata* também apresentaram efeito anti-inflamatório, através da redução da produção do mediador pró inflamatório NO nas concentrações de 50 e 100 µg/ml, tanto para o OE (36,94% e 51,06%), como para o EE (71,14% e 84,03%) respectivamente. Além disso, os dois produtos inibiram a migração celular de macrófagos RAW 264.7 em ambas as concentrações nos ensaios testados *in vitro*. Em geral, o EE mostrou ter um efeito biológico superior ao do OE. As análises fitoquímicas do OE identificaram 21 componentes, sendo os sesquiterpenos β-Elemeno (15,31%) e β-Cariofileno (13,22%) os constituintes majoritários. A fitoquímica do EE sugere a presença de flavonoides. Dessa forma, a *M. glomerata* se mostrou um promissor fitoterápico em potencial para o tratamento dessas doenças de alta mortalidade na população.

Palavras-chave: Câncer. Ciclo celular. Migração celular. Myrtaceae. Plantas medicinais.

ABSTRACT

SILVA, Nemes Veiga Pacheco . **Evaluation of antineoplastic and anti - inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Myrciaria glomerata O. Berg.***2019. 89 f . Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Myrciaria glomerata O. Berg, popularly known as “hairy hair”, has ascorbic acid and proven antimicrobial and antifungal properties. The objectives of this work involved the *in vitro* study of antineoplastic and antiinflammatory activity of Essential Oil (EO) and Ethanolic Extract (EE), extracted from *M. glomerata* leaves, collected in Tijuca Forest in Rio de Janeiro. The extraction of the EO was performed from the fresh biomass conditioned in Clevenger type apparatus, while the EE was obtained by exhaustive maceration with ethanol, filtration and evaporation of the solvent in rotary evaporator under reduced pressure, with yields of 0,17% (OE) e 7,67% (EE). The phytochemical study of *M. glomerata* materials was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Mass Spectrometer Gas Chromatography (GC-MS). The *in vitro* antineoplastic activity of OE and EE was investigated by MTT and trypan blue exclusion assays on leukemic (Jurkat and K562) and tumor (MCF-7, PC3 and A549) and VERO healthy cell lines. Its effects on cell cycle and apoptosis were studied with the Jurkat cells, which proved to be the most sensitive one. Antiinflammatory action was evaluated on macrophage lineage RAW 264.7 by nitric oxide (NO) production by Griess assay and cell migration by Wound healing and Boyding methods in LPS-activated RAW 264.7 macrophages *in vitro*. The EO, at concentrations of 50 and 100 µg / ml, reduced, respectively, the viability of K562 (11.24% and 11.77%), PC3 (15.65% and 25.21%), MCF7 (13). % and 27.8%) and Jurkat (14.84% and 28.31%). The EE (50 and 100 µg / ml) reduced, respectively, the viability of the K562 (11.42% and 15.74%), PC3 (21% and 21%), MCF7 (26.7% and 34.5) strains. %), Jurkat (16,5% and 77,6%) and A549 (20.0%) only at 100 µg / ml. The results obtained with *M. glomerata* showed for the first time that the extracted products had antineoplastic effect, mainly by EE on Jurkat cells (IC50 = 68.34 µg / ml), both cytostatic and cytotoxic, observed by the reduction of proliferation in a dose dependent manner and by increasing apoptosis at concentrations of 100 and 200 µg / ml respectively, without presenting cytotoxicity to the VERO cells. Both *M. glomerata* products also had anti-inflammatory effect, by reducing the production of pro-inflammatory NO mediator at concentrations of 50 and 100 µg / ml for both OE (36.94% and 51.06%), as for EE (71.14% and 84.03%) respectively. In addition, both products inhibited cell migration of RAW 264.7 macrophages at both concentrations in the *in vitro* tested assays. In general, EE has been shown to have a higher biological effect than EO. The phytochemical analyzes of the EO identified 21 components, being the sesquiterpenes β-Elemeno (15.31%) and β-Cariophilene (13.22%) the major constituents. EE phytochemistry suggests the presence of flavonoids. Thus, *M. glomerata* has shown to be a promising potential herbal remedy for the treatment of these high mortality diseases in the population.

Keywords: Cancer. Cell cycle. Cell Migration. Myrtaceae. Medicinal plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cavidade secretora contendo óleo essencial 23
Figura 2 – Câncer e ciclo celular..... 27
Figura 3 – Ilustração representando os cinco sinais cardinais da inflamação..... 29
Figura 4 – *Myrciaria glomerata* O. Berg..... 36
Figura 5 – Frutos de *Myrciaria glomerata* O. Berg 36
Quadro 1– Metodologias cromatográficas propostas por Wagner e Bladt..... 40
Figura 6 – Migração celular : metodologia ensaio de *Wound Healing*..... 47
Figura 7 – Modelo de Placa..... 48
Figura 8 – Modelo da câmara de *Boyding*..... 49
Figura 9 – Perfil cromatográfico do OE de *M. glomerata.* obtido por CG – EM... 50
Tabela 1 – Identificação dos constituintes do OE por CG-EM..... 51
Tabela 2 – Perfil fitoquímico do EE de *M. glomerata*..... 54
Figura 10 – Perfil cromatográfico para flavonoides do EE e frações de *M. glomerata* revelados por NP/PEG..... 55
Figura 11 – Perfil cromatográfico para flavonoides do EE e frações de *M. glomerata* revelados por reativo citro-bórico..... 56
Figura 12 – Perfil cromatográfico para saponinas do EE e frações de *M. glomerata* revelados por anisaldeído sulfúrico..... 57
Figura 13 – Perfil cromatográfico do EE de *M. glomerata.* obtido por CLAE–DAD-UV visto em 254 nm..... 58
Figura 14 – Varredura de espectro observada em UV das substâncias presentes no EE de *M.glomerata*..... 59
Tabela 3 – Percentual relativo (%) dos constituintes do EE de *M. glomerata*, com visualização no UV em 254 nm..... 60
Figura 15 – Citotoxicidade do OE e EE de *M. glomerata* sobre as linhagens celulares Jurkat e MCF.7 nos tempos de 24, 48 e 72 h..... 62
Figura 16 – Citotoxicidade do OE e EE de *M. glomerata* sobre as linhagens celulares A549, K562, Jurkat, PC3 e MCF.7 no tempo de72 h..... 63
Figura 17 – IC_{50} do EE encontrado para a Jurkat pelo método do MTT..... 64
Figura 18 – IC_{50} do EE de *M.* glomerata sobre a viabilidade de células Jurkat avaliada por exclusão de azul de tripam no tempo de 72 h..... 66
Figura 19 – Efeito biológico do EE de *M. glomerata* sobre o ciclo celular da linhagem Jurkat no tempo de 72 h. 68
Figura 20 – Efeito biológico do EE de *M.glomerata* sobre a apoptose na linhagem celular Jurkat no tempo de 72 h..... 69

Figura 21 – Citotoxicidade do EE de *M. glomerata* sobre a linhagem celular VERO no tempo de 72 h..... 71
Figura 22 – Efeito do OE e do EE na expressão de NO em linhagem RAW 264.7 ativada por LPS..... 73
Figura 23 – EC_{50} EE de *M. glomerata* na expressão de NO em linhagem RAW 264.7 ativada por LPS..... 74
Figura 24 – Ensaio de *Wound Healing*..... 76
Figura 25 – Migração celular: ensaio de *Boyden*..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Linhagem Celular de Adenocarcinoma de Pulmão
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	*American Type Culture Collection*
CE_{50}	Concentração da amostra para atingir 50% de efetividade
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detectores de Diodo
CO_2	Dióxido de carbono
COX -2	Ciclooxigenase 2
DEXA	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Extrato Etanólico bruto
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
FrAc	Fração Acetato de etila
FrBu	Fração butanol
FrDCM	Fração diclorometano
FrHe	Fração Hexano
IC_{50}	Concentração Inibitória Média
INDO	Indometacina
IFN γ	Interferon gama
IL1	Interleucina 1
IL4	Interleucina 4
IL 6	Interleucina 6
IL 10	Interleucina 10
IL 12	Interleucina 12
IL 13	Interleucina 13
IL 18	Interleucina 18
IL 23	Interleucina 23

iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
Jurkat	Linhagem Celular de Leucemia Linfocítica Aguda
K562	Linhagem Celular de Leucemia Mieloide Crônica
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
M2a	Macrófago tipo 2 ativado
M2b	Macrófago tipo 2 induzido
M2c	Macrófago tipo 2 ativado por IL-10
Mcf7	Linhagem Celular Tumoral de mama
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
OE	Óleo essencial
Pc3	Linhagem Celular de Câncer de próstata
RAW 264.7	Linhagem Celular de Macrófago murino
TLR	Receptor Toll-like
TOP1	Topoisomerase 1
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
Vero	Linhagem celular originária de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H_2O	Molécula da água
ml	Mililitro
cm	Centímetro
cm^3	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minuto
α	Alfa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 15
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
1.1 Importância das plantas medicinais 17
1.2 Família Myrtaceae 18
1.2.1 *Myrciaria glomerata* O. Berg 19
1.3 Metabólitos secundários 20
1.3.1 Óleos essenciais fitogênicos 22
1.3.2 Extrato e medicamento 24
1.4 Sistemas de análise cromatográfica 25
1.5 Câncer 27
1.6 Inflamação 28
1.6.1 Óxido nítrico 31
1.7 Câncer e inflamação 31
1.8 Culturas celulares 33
2 OBJETIVOS 34
2.1 Objetivos gerais 34
2.2 Objetivos específicos 34
3 METODOLOGIA 35
3.1 Material botânico 35
3.1.1 Obtenção do óleo essencial 37
3.1.1.1 Análise do óleo essencial 37
3.1.2 Obtenção do extrato etanólico 38
3.1.2.1 Obtenção das frações e do extrato etanólico 38
3.1.2.2 Análise do extrato etanólico 38
3.1.2.2.1 Testes fitoquímicos 39
3.1.2.2.2 Cromatografia em camada delgada 39
3.1.2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência 40
3.2 Cultura celular 41
3.3 Atividade antineoplásica 41
3.3.1 Citotoxicidade pelo ensaio do MTT 42
3.3.2 Citotoxicidade pelo ensaio de azul de trripan 42

3.3.3 Avaliação do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo 43
3.3.3.1 Citometria de fluxo 43
3.3.3.2 Ciclo celular utilizando o marcador fluorescente iodeto de propídio 43
3.3.3.3 Análise de apoptose por marcação com anexina-V 44
3.4 Avaliaçãaao da atividade anti-inflamatória 45
3.4.1 Ensaio de NO 45
3.4.2 Ensaio de *Wound Healing* 46
3.4.3 Ensaio de *Boyden* 48
3.5 Análise estatística 49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
4.1 Perfil cromatográfico do óleo essencial 50
4.2 Perfil cromatográfico do extrato etanólico 53
4.2.1 Testes colorimétricos fitoquímicos do extrato etanólico 53
4.2.2 Cromatografia em camada delgada 55
4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de diodo com ultravioleta visível 57
4.3 Avaliação da atividade antineoplásica 61
4.3.1 Citotoxicidade por MTT 61
4.3.2 Citotoxicidade por exclusão de azul de tripam 65
4.3.3 Avaliação do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo 67
4.4 Avaliação da citotoxicidade na linhagem normal VERO 71
4.5 Avaliação da aitividade anti-inflamatória 72
4.5.1 Ensaio de NO e citoxicidade em RAW 264.7 72
4.5.2 Ensaio de *Wound healing* 75
4.5.3 Ensaio de *Boyden* 77
CONSIDERAÇÕES FINAIS 79
REFERÊNCIAS 80

INTRODUÇÃO

A terapêutica contemporânea utiliza fármacos obtidos de fontes diversas as quais podem ser sintéticas ou naturais. As fontes naturais pressupõem origem a partir de plantas, animais, microrganismos, fungos ou minerais (KVIECINSKI, 2013). Contudo, desde os primórdios da humanidade o homem se utiliza das plantas com intuito de obter alívio e até mesmo a cura para as mais diversas enfermidades constituindo, portanto, uma das mais antigas formas de práticas medicinais (SERAFIN, 2006; FISCHER, 2007; SALVAGINI *et al.*, 2008; LOPES, 2008; NIEHUES *et al.*, 2011*)*. Assim, a utilização racional de plantas medicinais tem sido incentivada pela Organização Mundial de Saúde ao constatar que cerca de 80% da população mundial recorre à cultura popular para livrar-se de enfermidades. São muitos os fatores que vêm colaborando para o desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, inclusive econômicos e sociais (SALVAGINI *et al.*, 2008; NIEHUES *et al.*,2011).

A terapia alopática tem se mostrado eficiente contra várias enfermidades, porém muitas ainda apresentam baixo tempo de sobrevida, como é o caso do câncer (BEGALLI, 2013). O câncer tem sido apontado como um problema global de saúde pública (SILVA e OSORIO-DE-CASTRO, 2018). É em primazia uma das causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2017). Estima-se que nas próximas duas décadas aumentem em cerca de 70% a ocorrência de novos casos de câncer (INCA, 2017; SILVA e OSORIO-DE-CASTRO, 2018). No Brasil, dados do biênio 2018 – 2019, fornecidos pelo INCA, preveem a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer para cada ano, sendo predominantes os cânceres de próstata (68 mil), pulmão (19 mil) e mama feminina (60 mil), excluindo-se os cânceres de pele não melanoma. Outro índice alarmante refere-se às leucemias cuja estimativa de ocorrência é de 10.800 novos casos (INCA, 2017).

Sendo assim, além das estratégias de prevenção e diagnóstico, um componente essencial para o Programa Nacional de Controle do Câncer, é o tratamento (SILVA; OSORIO-DE-CASTRO, 2018). Begalli (2013) propõe a associação de várias terapias com vistas a obter melhores resultados no combate ao câncer; dentre elas pode-se citar a quimioterapia, que consiste na utilização de medicamentos a fim de destruir as células cancerosas bloqueando seu desenvolvimento. De acordo com Mesquita (2009), a maior

parte destes medicamentos deriva de plantas, organismos marinhos e microrganismos, nos quais há uma grande diversidade de compostos que atuam por diversos mecanismos.

Neste sentido, a utilização de plantas com propriedades medicinais sob a forma de extrato, fitofármacos e óleos essenciais adquiriram importância na terapêutica atual (FRANCO *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2006; MESQUITA, 2009; KVIECINSKI, 2013; MARQUES; LOPES, 2015). Porém para alcançar soluções efetivas deve-se buscar um estudo interdisciplinar, incluindo Botânica, Bioquímica, Biofísica, Ecologia, Microbiologia, Fitoquímica, Epidemiologia, por exemplo buscando privilegiar o diálogo entre as diferentes áreas do saber. O presente estudo traz uma abordagem fitoquímica e bioquímica com vistas a elucidar as possíveis atividades anti-inflamatórias e antitumorais dos produtos botânicos extraídos de *Myrciaria glomerata* O. Berg.

A espécie *M. glomerata* (O. Berg), conhecida popularmente como cabeludinha, pertencente à família da Myrtaceaes e, para qual a literatura descreve diversas sinonímias *Plinia glomerata* (Berg.), *Eugenia cabeluda* (Kiaersk) e *Eugenia tomentosa* (Berg.), (SERAFIN, 2006). Ademais, a escolha desta espécie deve-se tanto aos conhecimentos etnofarmacológicos, quanto a importância da família Myrtaceae, a qual destaca-se no reino vegetal por apresentar uma ampla variedade de espécies com potencial econômico e medicinal comprovados, como por exemplo, a atividade antimicrobiana e antiviral de seus óleos essenciais (DONATO; MORRETES, 2005, 2009; SERAFIN, 2006; FISHER, 2007; SOUZA, 2009; PACHECO-SILVA; DONATO, 2016).

Assim, a proposta deste estudo é avaliar *in vitro* a atividade antineoplásica, sobre as linhagens leucêmicas (Jurkat e K562) e tumorais (MCF-7, PC3 e A549), e anti-inflamatória, sobre a linhagem não tumoral RAW 264.7, do óleo essencial e extrato etanólico, obtidos de *M. glomerata* de modo que os resultados obtidos possam contribuir para a descrição dos efeitos biológicos desta espécie e, futuramente, possam ser utilizados com fins terapêuticos.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Importância das plantas medicinais

O Brasil é um dos países que detém a maior biodiversidade vegetal, aproximadamente 15 a 20% da totalidade mundial, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores, e onde apenas 8% são estudadas para pesquisas de compostos bioativos, e 1.100 espécies avaliadas em suas propriedades medicinais (BRASIL, 2006). Para Silva *et al.* (2011), tal riqueza biológica pode ser considerada aliada a uma sociodiversidade ao englobar vários povos e comunidades, cujos saberes e práticas culturais são particulares. No que tange ao uso terapêutico das plantas, tais saberes e práticas estão intrinsecamente relacionados à região e seus recursos naturais, sendo portanto, incorporados e reproduzidos sociocultural e economicamente nesses povos e comunidades.

De acordo com Carvalho (2011), houve um aumento mundial no uso de plantas medicinais e fitoterápicos nas últimas décadas, elevando o valor comercial deste mercado e, consequentemente, a preocupação das autoridades reguladoras quanto à segurança na autenticidade, na eficácia e na qualidade dos produtos. Além disso, tem crescido na literatura os relatos de acidentes envolvendo a administração de plantas medicinais cujos efeitos não foram devidamente identificados nem tão pouco detém boa qualidade. Carvalho (2011) menciona, ainda, o óbito de 12 pessoas nos Estados Unidos causado pela efedra, planta tradicionalmente usada para tratar congestão respiratória. Ele também relata que 70 pacientes belgas e 20 chineses apresentaram nefropatia, após a ingestão de fitoterápicos da Medicina chinesa, e foram submetidos a transplante renal e/ou diálise

A relevância das plantas medicinais é constatada pelo governo por meio do decreto n° 5.813, de 22/10/06, ao aprovar o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e sua inserção no sistema de saúde público através da Portaria GM nº 971, de 03/05/06, que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), onde se inserem as diretrizes para as implementações das plantas medicinais e fitoterápicos.

Desta forma, estudos interdisciplinares com vistas à investigação de sua atividade biológica são absolutamente pertinentes no cenário científico e econômico atual.

1.2 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae ocorre na Mata Atlântica brasileira e é reconhecida por apresentar interesse econômico e alto potencial medicinal (DONATO, 2003; DONATO; MORRETES, 2005, 2009; SOUZA, 2009; DOLL-BOSCARDIN, 2010; PACHECO-SILVA; DONATO, 2016). O interesse econômico está atrelado às numerosas espécies de importância ornamental e por possuírem frutos comestíveis, sendo possível destacar: a cabeludinha (*Myrciaria glomerata O. Berg*), a jabuticaba (*Myrciaria* spp.), a pitanga (*Eugenia uniflora L.*), a goiaba (*Psidium guajava L.*), a uvaia (*Eugenia pyriformis Cambes*), o cambucá (*Plinia edulis Vell. Sobral*), a grumixama (*Eugenia brasiliensis Lam*), a guabiroba (*Campomanesia xantocarpa Berg*), além de espécies florestais comerciais como o eucalipto (*Eucaliptus* spp.), cuja importância econômica é indiscutível (SERAFIN, 2006, VILELA, 2009; SOUZA, 2009; DÖLL-BOSCARDIN, 2010). O potencial medicinal de muitas de suas espécies tem sido comprovado experimentalmente, como por exemplo: atividade antibacteriana e antiviral de óleos essenciais, hipoglicemiante e anticancerígena dos extratos (DONATO; MORRETES, 2005, 2009; SERAFIN, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Cruz (2004) realizou estudo sobre o perfil químico e o uso popular de Myrtaceae e Melastomataceae. Seu levantamento revelou que 70% das citações correspondiam as espécies pertencentes à família Myrtaceae. De acordo com Villela (2009), no *ranking* nacional esta família ocupa o terceiro lugar entre as famílias de Angiospermas citadas para fins medicinais no Brasil.

Estima-se que existam nesta família, aproximadamente, 140 gêneros e cerca de 3.000 espécies, das quais "mais de 2 centenas das 1.200 espécies brasileiras apresentam frutos édulos e/ou medicinais e condimentares" (SERAFIN, 2006). Tais espécies se subdividem em duas subfamílias: *Myrtoideae* e *Leptospermoideae* presentes majoritariamente nas regiões tropicais e subtropicais da Austrália, Ásia e América, apesar de sua ocorrência cosmopolita.

Segundo Serafim *et al.* (2007), *Myrciaria glomerata* é conhecida popularmente como *cabeludinha* e possui frutos comestíveis. Trata-se de uma espécie nativa do Brasil cuja origem é a região Sudeste do país, sendo encontrada nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e parte Sul de Minas Gerais. Também é identificada na cultura popular como *"jabuticaba amarela"* e apresenta diversas sinonímias: *Plinia glomerata*, (Berg.), *Eugenia*

cabeluda (Kiaersk) e *Eugenia tomentosa* (Berg.). A classificação dada por Graziela Maciel Barroso, segundo Lopes (2008), propõe que a *M. glomerata* denomina-se *Myrciaria glazioviana*. Neste estudo, adotar-se-á classificação *M. glomerata*, por estar grafada desta maneira na Lista de Espécies da Flora do Brasil, disponibilizada *on line* desde 2010 e na Reflora 2020.

Assim, de acordo com Serafim (2006) e Fischer (2007) a taxonomia da família é complexa, e suas espécies são de difícil classificação e delimitação, justificando-se, portanto, a citação elevada de táxons indeterminados nos levantamentos bibliográficos, dados confirmados por Villela (2009) ao realizar o estudo genético utilizando espécies do gênero *Myrciaria.* Villela (2009) sugere que os principais caracteres de valor taxonômico são polimórficos dentro do gênero e afirma ser necessário definir as características morfológicas efetivamente discriminantes para as espécies.

Diante do exposto, compreendem-se, as diversas nomenclaturas existentes e, consequentemente, a necessidade de fornecer subsídios para identificação e autenticidade das espécies pertencentes ao gênero *Myrciaria* tendo em vista seu potencial econômico e biológico. Sabe-se que as mirtáceas são ricas em: óleos essenciais, flavonoides, taninos e triterpenos, sendo reconhecidas na cultura popular pelo seu uso no tratamento de enfermidades como a gota e o diabetes (KATO, BACCHI e HERNANDES, 2012; BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014). Assim, acredita-se que o estudo da anatomia foliar realizado por Pacheco-Silva eDonato (2016) contribuiu para a diagnose correta da espécie objeto deste estudo.

1.2.1 *Myciaria glomerata* O. Berg

A literatura detém raros estudos com esta espécie. Em 1955, Sobrinho *et al* descreveram a “cabeludinha” como uma das fontes mais ricas em vitamina C superando outras Myrtaceaes frutíferas nacionais e outros frutos brasileiros, bem como os exóticos.

Estudos realizados por Serafin (2005) admitem que a planta possui substâncias de interesse biológico. A continuidade desses estudos (SERAFIN, 2006; FISHER, 2007) revelou alto poder analgésico relacionado com a presença de substâncias fenólicas, cuja presença foi confirmada por Pacheco-Silva e Donato (2016), que admitem uma tendência a

atividade antimicrobiana, em diferentes extratos e frações, sem todavia isolar a (s) substância (s) responsável pela inibição, o que requer a continuidade dos estudos.

A análise dos óleos essenciais realizada por Serafin (2006) demonstrou que sua composição se constitui basicamente de germacreno B, α-cadinol, *β*-elemeno, cariofileno e germacreno D. Além disso, os testes realizados revelaram atividade antimicrobiana e antifúngica para o óleo essencial. De acordo com Lopes (2008) o OE de *M. glomerata* possui atividade equivalente ao antibiótico vancomicina e penicilina superior a penicilina para *B. cereus*, confirmando, portanto, os estudos de Serafim.

Ademais, a escolha da espécie *Myrciaria glomerata* deve-se à carência de dados científicos que comprovem seus efeitos biológicos e, espera-se em um futuro próximo, sua inclusão entre as espécies com potencial econômico, antineoplásico e anti-inflamatório comprovado, a exemplo do que ocorreu com o caju, o alho, o chá verde, o guaraná e outras dezenas de espécies vegetais que já foram estudadas (FUKUMASU *et al*., 2006). Sabe-se que mais de 60% dos agentes utilizados atualmente como quimioterápicos derivam direta ou indiretamente de recursos naturais (BRANDÃO, 2010).

1.3 Metabólitos secundários

O metabolismo vegetal produz moléculas altamente complexas, partindo de moléculas simples como nitrogênio e gás carbônico (POMPILHO *et al*., 2013). A biossíntese de tais moléculas ocorre por meio de rotas metabólicas específicas, em produtos primários ou secundários, que variam em concentração de acordo com as necessidades do organismo (SIMÕES *et al*. 2007; POMPILHO *et al*., 2013). Deste modo, os metabólitos primários estão relacionados às funções vitais da planta, sendo incluídos nesta classe: lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos. Entretanto, os metabólitos secundários são aqueles necessários à sobrevivência e perpetuação dos organismos no seu ecossistema (SIMÕES, *et al*., 2007).

Os metabólitos secundários são sintetizados a partir do metabolismo da glicose, sendo os dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores dos metabólitos secundários aromáticos (SIMÕES, *et al*., 2007; TAIZ e ZEIGER, 2008). Os derivados do acetato podem ser classificados conforme as seguintes vias metabólicas: ciclo do ácido cítrico, mevalonato,

produtos da condensação do acetato (SIMÕES *et al*. 2007; TAIZ e ZEIGER, 2008). Há, ainda, metabólitos secundários que não derivam exclusivamente de um desses intermediários, mas resultam da combinação do ácido chiquímico com acetato e/ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, flavonoides, e taninos condensados (SIMÕES *et al*. 2007; TAIZ e ZEIGER, 2008).

Os metabólitos secundários estão normalmente presentes em pequenas quantidades, em função da baixa atividade de suas vias metabólicas, e com o fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicas das plantas. O metabolismo secundário é ativo somente em alguns períodos do desenvolvimento do vegetal. A síntese de metabólito secundário tem sido atrelada ao estresse causado por ataque de microrganismos e insetos, escassez de nutrientes e fatores ambientais (SIMÕES *et al*., 2007).

Os metabólitos secundários de plantas e seus derivados semi-sintéticos desempenham um papel importante na quimioterapia anticâncer, sendo utilizados atualmente para tratar alguns tipos de leucemias, linfomas e tumores sólidos (CHABNER *et al.*, 2005; DE VITA *et al.*, 2008). Existem quatro principais classes estruturais de compostos derivados de plantas em uso clínico, alcaloides da vinca (vimblastina, , vincristina, vinorelbina), os linhanos de epipodofilotoxina (etoposídeo, teniposídeo, etoposideo fosfato), os taxanos diterpenoides (taxol, paclitaxel, docetaxel), e a camptotecina quinolina, derivada dos alcaloides (toptotecano, irinotecano) (ALMEIDA *et al.*, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2010; NEWMAN e CRAGG, 2012).

Além disso, vêm crescendo também, os estudos que comprovam a propriedade anti-inflamatória dos metabólitos secundários das plantas (CALIXTO, 2000; FISCHER, 2007; DUTRA *et al.*, 2016). Dentre eles pode-se citar: o azuleno, extraído do óleo de *Eucaliptus sp* (LYSENKO, 1967), a flavona bavaquinina, extraída da semente de *Psoralea coryylifolia* (ANAND *et al.*, 1978) e o flavonoide hipolaetina-8-glucosídeo obtido da *Sideritis mugronensis*, sendo esse mais potente que a fenilbutazona, anti-inflamatório não esterioidal que pode causar lesões gástricas. Ao contrário desse medicamento, o flavonoide hipoaletina-8-glucosideo não desencadeou úlceras gástricas (VILLAR *et al.*,1985).

Diante do exposto é evidente que todo candidato a fármaco, seja de origem natural ou sintética, antes de chegar à clínica médica, deve cumprir um critério tão óbvio quanto primordial: exibir um alto efeito benéfico com mínimos efeitos colaterais (BARREIRO *et al*., 2002).

Melo et al. (2011) fizeram um levantamento e documentaram 84 plantas da flora brasileira citadas como tendo atividade antitumoral. Dessas, apenas para 36% foram

realizados estudos *in vitro* e/ou *in vivo*, e apenas três extratos e uma substância estão sendo utilizados em ensaios clínicos (MELO *et al.*, 2011). Embora várias espécies com potencial anti-inflamatório tenham sido descritas, o uso clínico ainda é insipiente. Neste sentido as espécies vegetais disponíveis na biodiversidade das florestas brasileiras atuam como reservatório de novas substâncias com potencial terapêutico.

1.3.1 Óleos essenciais fitogênicos

Os óleos essenciais fitogênicos, são metabólitos secundários, também denominados óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Constituem um amplo conjunto de substâncias complexas cuja principal característica é a volatilidade diferenciando-os dos óleos fixos, que são constituídos da mistura de substâncias lipídicas extraídas geralmente de sementes (SIMÕES *et al*., 2007). Na fitoterapia, os óleos essenciais se destacam por suas propriedades analgésicas, antimicrobianas, sedativas, expectorantes, estomáquicas, estimulantes, anticancerígena, fungicida e inseticida, gerando grande interesse econômico devido à sua aplicabilidade industrial (LOPES, 2008).

A ISO (*Internacional Standard Organization*) define óleos voláteis como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos.

De acordo com Simões *et al.* (2007) a classificação química da maioria dos óleos essenciais fitogênicos contém derivados de fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo os últimos preponderantes sob a forma de monoterpenos (em 90% dos óleos) e sesquiterpenos.

Ainda de acordo com Simões *et al.* (2007), a localização desses óleos varia de acordo com a família. Podem estar presentes nas estruturas secretoras e/ou nos mais diversos órgãos do vegetal, como, por exemplo, nas flores (laranjeira), nas folhas (capim limão, eucalipto e louro) ou ainda nas cascas do caule (canela), nos rizomas (gengibre), nos frutos (erva doce) e até mesmo na semente (noz moscada). Contudo, óleos essenciais obtidos de uma mesma planta podem variar sua composição química, as características físico-químicas e inclusive o odor.

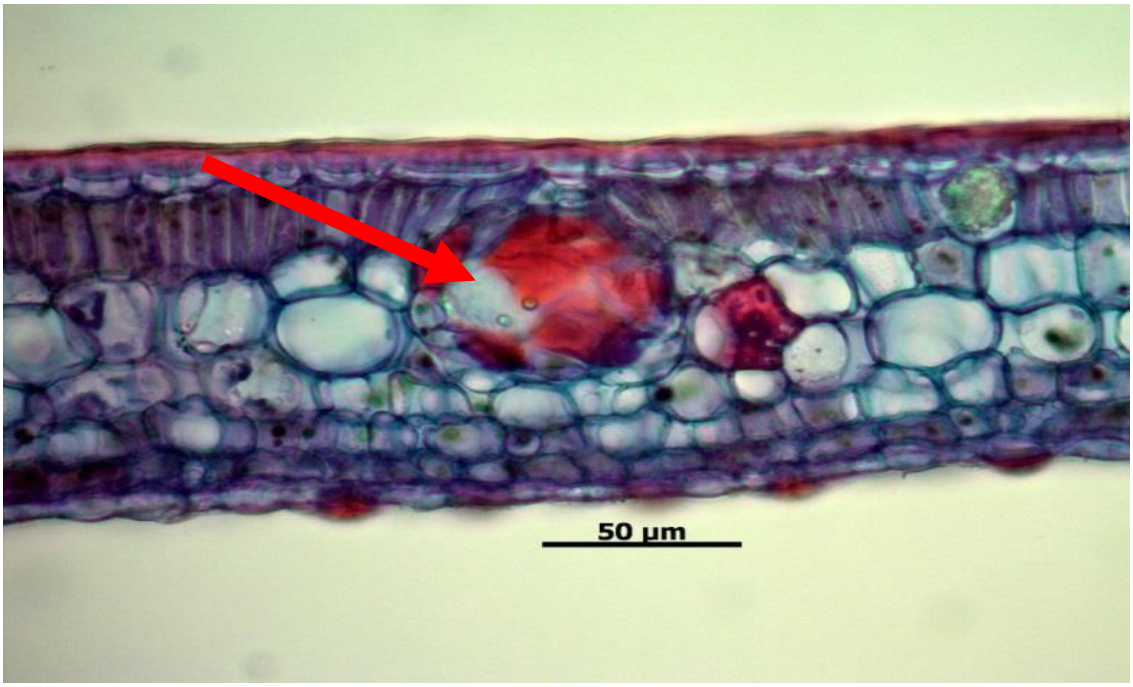
Além disso, a composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época da coleta, das condições climáticas e do solo (CERQUEIRA *et al.*2007).

Assim, os autores admitem ser desejável coletar plantas ricas nesses óleos essenciais nas primeiras horas do dia ou a noite, visto que o período de exposição solar pode carretar em perda quantitativamente significativa do óleo presente no vegetal.

Simões *et al.* (2007) diz que a extração é variável de acordo com a localização do óleo e sua respectiva utilização. Dentre as metodologias mais comumente utilizadas encontram-se a enfloração, a extração com solventes orgânicos, a prensagem (ou expressão), a extração do fluido supercrítico geralmente por CO_2 e a hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger*, sendo esta última adotada neste estudo.

Quanto à conservação, Simões *et al.* (2007) descreveram que as substâncias dos óleos essenciais possuem instabilidade relativa, sendo necessário, o uso de embalagens neutras, feitas de alumínio, aço inoxidável ou vidro âmbar completamente cheios e hermeticamente fechados, para minimizar as degradações, devendo ser mantidos em baixas temperaturas preferencialmente em atmosfera de nitrogênio.

Figura 1 – Cavidade secretora contendo óleo essencial.



Legenda: Secção transversal, à mão livre, da lâmina foliar.
Nota: A seta vermelha indica a cavidade secretora contendo óleo essencial presente no mesofilo foliar. A coloração foi realizada com safrablau e safranina aquosa, ambas a 1%, na proporção de 9:1 (v/v).
Fonte: PACHECO-SILVA e DONATO, 2016.

Além disso, um dos problemas relacionados à qualidade dos óleos essenciais está na identificação incorreta da planta, da qual o produto foi obtido, gerando confusão acerca das propriedades de cada produto sugerindo maior rigor no controle de qualidade e realização

de exames morfológicos e microscópicos comuns para realizar a visualização *in situ* dos óleos essenciais. Assim sendo, o estudo realizado por Pacheco-Silva e Donato (2016) confirma a existência de cavidades secretoras de óleo essencial na espécie utilizada neste estudo como pode ser observado na Figura 1.

1.3.2 Extrato e medicamento

O potencial químico dos produtos de origem natural tem sido destaque nos últimos anos, principalmente, considerando o fato de que cerca de 50% dos medicamentos utilizados na clínica médica para o tratamento de neoplasias, em todo o mundo, são oriundos de produtos naturais ou de seus derivados semi-sintéticos (MARQUES; LOPES; 2015).

Devido à crescente demanda do uso de produtos naturais, os extratos estão cada vez mais em foco. De acordo com a 1ª edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2011), extratos são uma preparação de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtida a partir de material animal ou vegetal. A matéria prima utilizada na preparação de extratos pode passar por tratamento preliminar, tais como: inativação de enzimas, moagem ou desengorduramento. Admite-se ainda que o extrato seja obtido por percolação, maceração ou outro método adequado e validado, utilizando como solvente álcool etílico, água ou outro solvente adequado. Após a extração, materiais indesejáveis podem ser eliminados.

Entretanto, deve-se ressaltar a diferença entre a droga vegetal e derivado vegetal. A droga vegetal compreende a planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, que causam a ação terapêutica, após processos de coleta, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. Já o conceito derivado vegetal se refere ao produto da extração da planta medicinal *in natura* ou da droga vegetal, podendo ocorrer na forma de extrato, tintura, alcoolatura, óleo fixo e volátil, cera, exsudado e outros (ANVISA, 2018).

Drogas vegetais obtidas de extratos vegetais são comercializadas sob a forma de tinturas no tratamento de doenças. É o caso, por exemplo, da tintura de *Alpinia zerumbet*, conhecida popularmente como colônia, indicado como diurético e anti-hipertensivo nos casos de hipertensão arterial; da *Aloe vera*, conhecida como babosa, usada como gel e pomada é indicada como cicatrizante. Outros exemplos são o óleo de *Eucalyptus globulus*,

indicado para auxiliar no tratamento sintomático da tosse produtiva associada ao resfriado comum, e o gel de *Arnica montana*, indicado como anti-inflamatório em contusões e distensões, nos casos de equimoses e hematomas (ANVISA, 2018). Deste modo, os extratos são substâncias com fortes indícios terapêuticos e são verdadeiros remédios (ANVISA, 2018). Este tema é tão relevante que em 1958, o *U. S. National Cancer Institute* iniciou um programa destinado a estudar 35.000 espécies de plantas com objetivo de descobrir quais possuíam atividade antitumoral (SAUDE-GUIMARAES; RASLAN; OLIVEIRA, 2014). Após cinco anos o extrato da casca de *Taxus brevifolia* foi identificado com esta propriedade. A droga derivada é paclitaxel (Taxol).

De modo geral, os estudos envolvendo extratos são cada vez mais necessários para que se possa desenvolver novas abordagens terapêuticos (FUKUMASU *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2017).

1.4 Sistemas de análise cromatográfica

A cromatografia tem sido considerada uma ferramenta perfeita para analisar os constituintes da planta (CHOMA; JESIONEK, 2015) e, por se tratar de uma mistura complexa, tem sido aplicada à triagem em fitoquímica (CAVALARO; OLIVEIRA, 2018). O método apresenta vantagens em termos de tempo de análise, maior resolução e maior sensibilidade (LANÇAS, 2009; LAI; FRANKE, 2013). Pode ser compreendida como técnicas de separação e isolamento, com abordagens qualitativas e quantitativas, de uma mistura complexa. Essas devem interagir com uma fase estacionária e através de uma fase móvel que flui continuamente por tempo determinado e controlado. A separação dos constituintes do composto ocorrerá em momentos distintos. A variação acontece de acordo com os níveis e tipos de interações do composto com a fase estacionária e a fase móvel (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; LANÇAS, 2009; CAVALARO; OLIVEIRA, 2018). Ou seja, os componentes mais fortemente adsorvidos à fase estacionária se deslocam mais lentamente, enquanto os componentes que interagem fracamente com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. De acordo com a literatura, as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) são amplamente utilizados na identificação e elucidação de estruturas nos compostos de plantas para orientar estudos farmacognósticos, onde a fitoquímica é um dos

estágios de grande importância para a descoberta de novos compostos vegetais com atividades biológicas relevantes (CAVALARO; OLIVEIRA, 2018).

A cromatografia em camada delgada (CCD) também conhecida como TLC, do inglês *Thin layer chromatography*, é uma técnica amplamente utilizada na área cromatográfica devido à simplicidade, uma vez que não requer equipamentos complexos e treinamento extensivo dos praticantes bem como a identificação e determinação de compostos em uma amostra, determinação dos melhores solventes para a separação, aceitação de grandes quantidades de amostras, menor tempo de análise e sem necessidade de limpeza exaustiva das amostras, por exemplo, com a aplicação de extratos vegetais em bruto (KOKOTKIEWICZ, A. *et al,* 2017; CAVALARO; OLIVEIRA, 2018).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também conhecida como HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*, é uma técnica amplamente usada em análise fitoquímica devido à necessidade de mapeamento, monitoramento e quantificação de vários compostos presentes em extratos de plantas (CAVALARO; OLIVEIRA, 2018). Dentre as vantagens da técnica destacam-se: à alta velocidade de obtenção dos resultados, identificação e quantificação de substâncias em pequenas concentrações, a grande capacidade de separação de compostos complexos em frações polares e apolares (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; LANÇAS, 2009) dos extratos vegetais (CAVALARO; OLIVEIRA, 2018). A técnica apresenta alta reprodutibilidade para monitorar, qualificar e/ou quantificar os metabólitos secundários já conhecidos, são denominados marcadores. Uma vantagem dessa técnica é o uso de quantidades mínimas de extrato de planta. Por essa razão vem sendo utilizada em controles de qualidade, assegurando a identidades dos extratos ao distinguir a diversidade de moléculas, dificultando assim a contaminação cruzada ou a falsificação (CAVALARO; OLIVEIRA, 2018).

A cromatografia por fase gasosa (CG) também conhecida como GC do inglês, *gas chromatography*, é amplamente utilizada para a análise de compostos apolares, como por exemplo óleos essenciais, obtidos de plantas. A técnica CG acoplada a um detector de massa fornece o perfil dos compostos vegetais. Nesta técnica é possível analisar numerosos compostos das fases oleosas, além de agregar informações a partir de bancos de dados disseminados (KESKES *et al.* 2017; CAVALARO; OLIVEIRA, 2018).

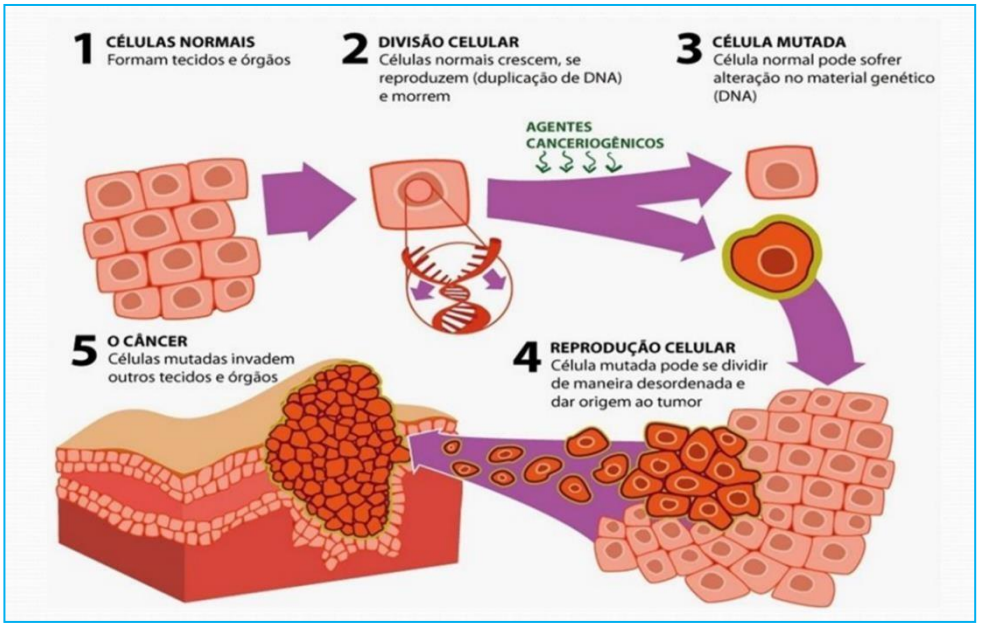
Portanto a cromatografia tem sido amplamente utilizada nos estudos de triagem fitoquímica para identificar novos compostos, e para confirmar compostos já conhecidos. Além disso, há a possibilidade de verificar a atividade biológica dos metabólitos da planta e elucidar a estrutura desses compostos para uma melhor compreensão da fisiologia das

plantas e sua aplicabilidade para fins farmacêuticos, uma vez que é uma área de grande crescimento (CAVALARO; OLIVEIRA, 2018).

1.5 Câncer

A célula cancerosa surge quando uma célula normal é induzida a mudar suas características naturais (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; INCA, 2017). Entre essas características destacam-se: a reprodução celular desordenada e a inibição de apoptose. A reprodução celular desordenada ocorre em um determinado momento do período vital da célula. Essa passa a se reproduzir aceleradamente, aumentando sua população e inibindo a apoptose, que é um processo fisiológico natural de morte celular programada e controlada intracelularmente através da ativação de enzimas que degradam o DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. Com a inibição do processo de apoptose, a célula cancerosa prolonga seu ciclo vital por tempo indeterminado (INCA, 2017).

Figura 2 – Câncer e o ciclo celular



Legenda: Processo de formação das neoplasias e/ou tumores

Nota: A formação do tumor se deve ao acúmulo de células anormais

Fonte: Retirada de: https://i0.wp.com/www.ciclocelular.com.br/wp-ntent/uploads/2015/06/cancer-e-o-ciclo-celular.Jpg

A formação do tumor se deve ao acúmulo de células anormais (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001; INCA, 2017), como mostra a Figura 2, como consequência desses dois processos, que em geral ocorrem de forma individualizada. Diversos eventos biológicos induzem uma célula normal se tornar cancerosa, dentre os quais três são bem conhecidos: 1) infecção por vírus específicos, que alteram o controle genético da célula, interferindo no DNA; 2) indução por agentes físicos (raio X e outras radiações) ou agentes químicos (ex.: HO· ou radical hidroxila) que promovem a quebra cromossômica; 3) mutações espontâneas (*fresh mutation*) que provocam quebras cromossômicas com translocações dos pedaços desses cromossomos, deleção de bases nitrogenadas do DNA, ou mutação de bases nitrogenadas. Todas essas alterações são capazes de induzir a atividade de oncogenes (CARNEIRO; PINTO; PAUMGARTTEN, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Embora a célula tenha sido transformada geneticamente, a sua capacidade de se tornar uma célula cancerosa é muito pequena. Isto porque ela precisa "ser aceita" no ambiente celular ou tecidual em que ela está inserida. Na maioria das vezes, essas células são rejeitadas por meio de três mecanismos biológicos: 1) a célula cancerosa recém-formada torna-se inviável e é eliminada daquele ambiente celular; 2) a célula cancerosa consegue se reproduzir no tecido, mas disputa com as células normais os nutrientes disponíveis no ambiente. A falta de vascularização limita o suprimento de nutrientes das células cancerosas recém-formadas. Essa falta de vascularização é natural nos tecidos em que as células cancerosas estão instaladas; 3) o surgimento de célula (s) cancerosa(s) desencadeia forte reação imunológica (ALMEIDA *et al.*, 2005 ONUCHIC; CHAMMAS,2010).

1.6 Inflamação

A reação inflamatória foi inicialmente descrita pelo médico romano Cornelius Celcius (178 AC), como sendo calor, rubor, edema e dor. Em 1858, Galen acrescentou a estes a perda de função (ROCHA e SILVA, 1978; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985) como mostra a Figura 3, representando os cinco sinais cardinais da inflamação. Atualmente, já está bem estabelecido que estes sinais são consequência da liberação de substâncias químicas no local da injúria (por exemplo, histamina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos), originando os dois componentes básicos da inflamação: as alterações vasculares e o acúmulo de células (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A inflamação é um processo biológico normal do organismo. Ocorre em resposta a alguma infecção, desafio antigênico ou injúria tecidual. A inflamação tem a função de defender o organismo e restaurar a homeostase ao eliminar o patógeno ou o agente irritante, e potencializar o reparo tecidual. Entretanto, se a resposta for excessiva, pode ser prejudicial, podendo levar à injúria tecidual e a descompensação fisiológica, disfunção de órgãos e até mesmo a morte (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; FERNADES, 2018).

Figura 3 – Ilustração representando os cinco sinais cardinais da inflamação.

Legenda: A figura representa os cinco pontos cardinais da inflamação: calor, rubor, edema, dor e a perda de função
Nota: A reação inflamatória descrita pelo médico romano Cornelius Celcius (178 AC) e por Galen (1858)
Fonte: Adaptado de Lawrence *et al*., 2002.

A finalidade da resposta inflamatória é remover o estímulo indutor da resposta (infecção ou injúria tecidual) e iniciar o reparo tecidual. De acordo com o tempo de duração e com suas características patológicas, a inflamação pode ser dividida em inflamação aguda e inflamação crônica. Na inflamação aguda predominam os neutrófilos e macrófagos, que são os elementos da imunidade inata. A persistência do processo inflamatório agudo e a incapacidade de eliminar o estímulo nocivo gera novas características no infiltrado, como a substituição de neutrófilos por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL *et. al.*, 2010).

Os macrófagos são considerados como a célula reguladora mais importante da fase inflamatória (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). A população de macrófagos não é homogênea. Isso porque muitos monócitos recrutados da circulação, ao adentrar no tecido, se diferenciam em macrófagos com fenótipos distintos, de acordo com fatores presentes no local. Os macrófagos se diferenciam em M1 e M2 de acordo com o modo de ativação, receptores e citocinas produzidas (ONUCHIC e CHAMMAS, 2010; SIMÕES *et al.*, 2017). Os macrófagos do tipo M1 são ativados por produtos microbianos ou IFN-γ e produzem citocinas próinflamatórias, como interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18), interleucina-23 (IL-23), Interferon-gamma (IFN-γ), fator de necrose tumoral-α (TNF-α), e atuam na resposta contra patógenos (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; SIMÕES *et al*, 2017). Os macrófagos do tipo M2, por sua vez, são ativados por citocinas como interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), possuem receptores de manose e galactose, e produzem VEGF, IL-6, IL-10, PG, iNOS, IDO, agindo no reparo tecidual, remodelação, e angiogênese (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; SIMÕES *et al.*, 2017). O grupo M2 é subdividido de acordo com o modo de ativação em M2a, ativado por exposição a interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13); M2b, induzido por exposição combinada a imunocomplexos e agonistas de receptores *Toll-like* (TLR) ou receptor de interleucina-1 (IL-1); e M2c, ativado por IL-10. Os dois primeiros estão mais relacionados a funções de regulação imune, enquanto o último age mais na supressão da resposta imunológica e na remodelação tecidual (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). Ademais, os macrófagos são células do sistema imunológico que, quando ativadas, produzem o óxido nítrico (NO), um importante mediador inflamatório (GRIVENNIKOV; KARIN, 2010; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; HANAHAN; COUSSENS, 2012; PESIC; GRETEN, 2016; GOSWAMI *et al.*, 2017).

1.6.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma das moléculas mais simples sintetizadas pelo organismo. É um radical livre, inorgânico, de natureza gasosa e incolor. Ele possui a capacidade de se difundir através das membranas em quase todos os sistemas biológicos. Esta molécula apresenta um elétron não pareado que reage com o oxigênio, radical superóxido, entre outros (KIECHELE; MARLINSKI, 1993; DUSSE, VIEIRA; CARVALHO, 2003).

O NO é um dos principais mediadores citotóxicos de células imunes efetoras ativadas, principalmente macrófagos e células endoteliais. O NO é sintetizado no organismo pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), através da oxidação da L-arginina. Essa reação produz NO e L-citrulina (KORHONEN *et al.*, 2005), onde o doador de elétrons é a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH).

Em mamíferos as NOS possuem três principais isoformas: a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzida (iNOS). A eNOS e a nNOS são constitutivas (LENON *et al.*,2008). A enzima iNOS contém um domínio C-terminal redutor, que liga NADPH transferindo elétrons para flavina adenina dinucleotídeo (FAD), e então para flavina mononucleotídeo (FMN); outro domínio N-terminal oxidante contendo um grupo heme, e sítios de ligação de arginina, tetrahidrobiopterina e calmodulina. Ao contrário das outras isoformas, a iNOS é independente de cálcio para sua ativação.

1.7 Câncer e inflamação

Pesquisas têm demonstrado uma importante associação entre inflamação e câncer, evidenciando que a inflamação crônica é um dos fatores epigenéticos que mais contribuem com o surgimento e a progressão tumoral (CONDEELIS; POLLARD, 2006; WEI *et al.*, 2007; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; WU *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2017). Os indivíduos portadores de bronquite crônica, por exemplo, têm maior probabilidade de desenvolver câncer de pulmão (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). Entretanto, o uso crônico de agentes anti-inflamatórios não-esteroidais reduz a formação tumoral. Admite-se que o sistema imune atue em dois momentos distintos: previamente à existência da célula tumoral (promovendo e/ou contribuindo para transformação da célula normal em cancerígena) e, posteriormente, efetivando tanto a instalação quanto a progressão tumoral (GOMES-CARNEIRO; RIBEIRO-PINTO; PAUMGARTTEN, 1997; INCA, 2018).

Diversos estudos mostram que as células tumorais tendem a surgir em sítios de inflamação crônica (WU *et al.*, 2014; REUTER *et al.*, 2016). Provavelmente devido a presença de células do sistema imune decorrente da regeneração tecidual contínua. Nesta situação há uma maior possibilidade de ocorrer mutações, e, consequentemente, proliferação dessas células mutadas; o surgimento de uma microrregião mutagênica, devido a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas células imunes recrutadas; e promoção

de angiogênese (neovascularização), classicamente presente em processos inflamatórios, e já descrita como uma alteração fundamental para o desenvolvimento tumoral (WEI *et al.*, 2007; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; SINGH *et al.*, 2017).

Sendo assim, apesar da resposta inflamatória fazer parte da defesa natural do organismo, estudos recentes apontam para uma estreita conexão entre inflamação e o câncer (REUTER *et al.*, 2016). A revisão realizada por Hanahan e Weinberg (2000) propôs seis alterações fundamentais na fisiologia celular que, segundo os autores, são responsáveis por governar e transformar uma célula normal em cancerígena: autossuficiência em emissão de sinais de proliferação, insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, capacidade de evadir da apoptose, capacidade replicativa ilimitada, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase.

Tais alterações vêm sendo associadas a crescente malignidade do câncer, uma vez que as células cancerígenas conseguem driblar os mecanismos de defesa contra o desenvolvimento tumoral (WU *et al.*, 2014).

Diversos mecanismos desencadeados pela inflamação podem contribuir para a carcinogênese, dentre os quais, destacam-se: a secreção elevada, ou ativação anormal de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, ciclooxigenase-2, prostaglandinas, óxido nítrico sintase induzível e óxido nítrico, e uma rede distinta de moléculas sinalizadoras intracelulares, incluindo cinases e fatores de transcrição, facilitam a promoção e a metástase tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000; KUNDU e SURH, 2008; HANAHAN; COUSSENS, 2012; SINGH *et al.*, 2017).

Metástase é um processo patológico onde as células penetram nos tecidos conseguindo acesso aos vasos linfáticos e sanguíneos nos quais serão conduzidas a outras localidades do corpo (INCA, 2011). Os tumores sólidos são tipicamente infiltrados com células do sistema imunológico e a inflamação afeta a maioria, senão todos os estágios da tumorigênese. As vias moleculares e celulares, que ligam a inflamação e o câncer, surgiram como alvos atraentes para a prevenção e a terapia (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; HANAHAN; COUSSENS, 2012).

Embora “inflamação e câncer” tenham se tornado uma “assinatura” para a interseção de tumores com o sistema imunológico, muitos tumores mostram infiltrações sutis de células imunes que não atendem à definição clássica de uma resposta imune inflamatória e ainda são funcionalmente instrumentais nos fenótipos tumorais (HANAHAN; COUSSENS, 2012). A frequência das alterações no microambiente tumoral pode afetar de forma importante a resposta imune no interior do tumor (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

1.8 Culturas Celulares

A cultura de células é uma ferramenta importante para estudo da citotoxicidade de compostos com potencial atividade terapêutica (KLENICY *et al.*, 2013), já que novas moléculas, incluídos os fitoterápicos, utilizados como medicamentos antineoplásicos, só podem ser usadas na prática, seja em humanos ou animais, após a comprovação de sua ação sobre às células doentes, de modo que os efeitos tóxicos para os pacientes sejam os menores possíveis. Para isso, testes *in vitro* têm sido utilizados a fim de avaliar a toxicidade destes agentes. A técnica de cultivo celular não substitui as pesquisas *in vivo.* Entretanto, vem sendo utilizada em ensaios preliminares, como uma alternativa ao uso de animais de laboratório, pois apresentam resultados mais rápidos, sensíveis e financeiramente viáveis (KVIECINSKI, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Estudar a atividade antineoplásica e anti-inflamatória *in vitro* do óleo essencial e do extrato etanólico de folhas *Myrciaria. Glomerata.*

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo consistem em:

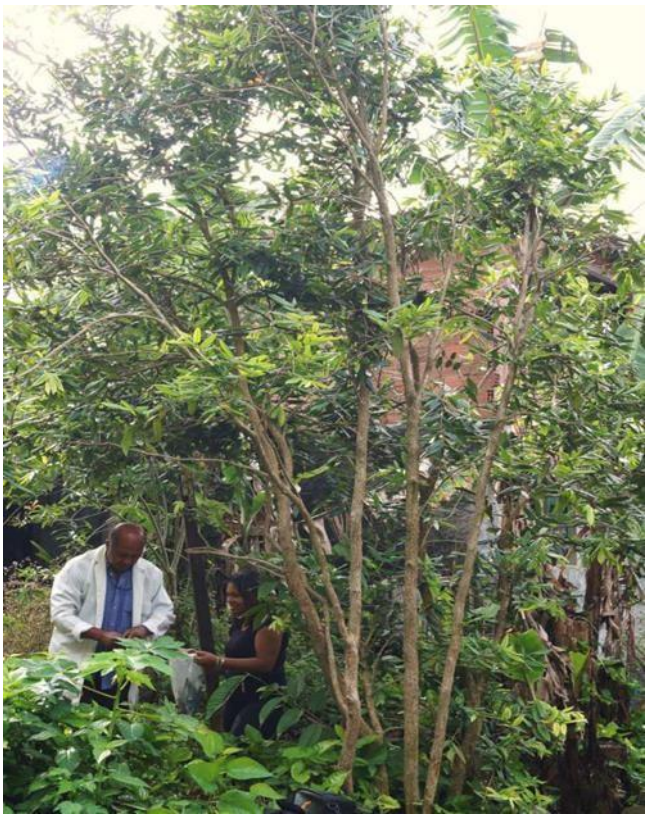
a) extrair o óleo essencial e o extrato etanólico das folhas de *M.* glomerata;
b) determinar o perfil fitoquímico do óleo essencial por cromatografia de fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM), e do extrato etanólico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
c) avaliar a citotoxicidade *in vitro* de *M. glomerata*, sobre linhagens leucêmicas (Jurkat e K562) e tumorais (MCF-7, PC3 e A549), e células VERO;
d) estudar o efeito do óleo essencial e do extrato etanólico de *M. glomerata* sobre a proliferação celular da (s) linhagem (ns) mais sensível (eis);
e) investigar a ação anti-inflamatória de *M. glomerata in vitro*;
f) estudar os efeitos de *M. glomerata* sobre o ciclo celular e apoptose da linhagem mais sensível.

3 METODOLOGIA

3.1 Material Botânico

O material estudado foi coletado por Pacheco-Silva e Dantas, às 6 h30 min, aos dezessete dias do mês de novembro de dois mil e dezesseis, na Floresta da Tijuca – Estrada das Furnas, nº 1984, Alto da Boa Vista, RJ – a qual é parte da Mata Atlântica, que se caracteriza por apresentar temperaturas amenas e alta pluviosidade. A região onde os exemplares estão localizados apresenta boa luminosidade e situa-se próximo a moradias construídas de forma desordenada. Ressalta-se a descrição de Machado (1992) a qual se refere às matas do Parque Nacional da Tijuca, como pertencentes à classe de formação de Floresta Ombrófila Densa. A região contém indivíduos com características juvenis e adultas. Os primeiros apresentam, aproximadamente, 3,5 a 4 m de altura e 5 a 10 cm de diâmetro (Figura 4). Os indivíduos mais desenvolvidos apresentam cerca de 6 m de altura com o diâmetro aproximado de 15 a 20 cm. Estes últimos encontravam-se em fase de frutificação no momento da coleta (Figura 5). A identificação da *Myrciaria glomerata* para o presente estudo foi realizada, por Pacheco-Silva e Donato (2016), através da análise morfológica de suas estruturas vegetativas e reprodutivas com auxílio de microscópio estereoscópico e bibliografia especializada. As exsicatas confeccionadas estão depositadas no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro com o número de registro HRJ 012450. A pesquisa científica com *M. glomerata* está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético SisGen
sob a identificação A5CF97 desde 05/11/2018.

Figura 4 – *Myrciaria glomerata* O.Berg



Legenda: Indivíduo adulto medindo aproximadamente 4 m.de altura. Note a proximidade com moradias.

Nota: A foto foi cortesia do Prof. Dr: Antônio Carlos de Freitas Departamento de Biofísica/IBRAG/UERJ

Fonte: Pacheco-Silva e Donato, 2016.

Figura 5 – Frutos de *Myrciaria glomerata* O. Berg

Legenda: Fruto verde a esquerda e fruto maduro a direita. Folhas e frutos revestidos de tricomas tectores

Nota: A foto foi cortesia do Prof. Dr: Antônio Carlos de Freitas Departamento de Biofísica/IBRAG/UERJ

Fonte: Pacheco-Silva e Donato , 2016.

3.1.1 Obtenção do óleo essencial

Após a coleta as folhas frescas de *M. glomerata* foram acondicionadas em gelo para serem transportadas aos laboratórios (LPPN – laboratório de pesquisas em produtos naturais, DBV/UERJ e LIABPPN– Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais DBQ/UERJ) onde foram devidamente processadas. A biomassa fresca foi pesada (132,72 g) e submetida à hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger* por um período de 4h, a partir do início da fervura da água contida no balão (SIMÕES *et al.*, 2007; LOPES, 2008; SILVA *et al.*, 2015).

3.1.1.1 Análise do óleo essencial

A análise do OE de *Myrciaria glomerata* foi efetuada por CG-EM em equipamento Shimadzu 17A - Shimadzu QP 2010 Plus, usando coluna capilar de gel de sílica fundida Rtx-5MS, da marca Restek (30 m x 0,32 mm i.d. x 0,25 µm, tamanho de partícula). A programação de temperatura usada foi: injetor 260°C, detector 290°C e forno variando de 50°C até 290°C (3°C/min). O óleo essencial foi solubilizado em diclorometano na concentração de 1 mg/ml, sendo injetado 1 µl da solução preparada. Hélio foi usado como gas de arraste, com fluxo constante de 1,0 ml/min

A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada pela comparação dos seus índices de retenção e espectros de massas (EM) com dados da literatura publicados e com a biblioteca WILEY 275 e NIST 3.0, fornecidas pelo sistema GC-EM (Shimadzu 17A - Shimadzu QP 2010Plus). Os resultados também foram confirmados comparando a ordem de eluição das substâncias com seus índices de retenção relativos, relatados na literatura especializada (Adams, 2007). Os índices de retenção foram calculados para todos os componentes voláteis utilizando os dados de retenção de n-alcanos lineares com C_9-C_{30}, conforme descrito por Holler et al. (2009).

3.1.2 Obtenção do extrato etanólico

Para o preparo do EE as folhas de *M. glomerata* foram conduzidas no LPPN – NBV/UERJ, onde foram submetidas à secagem em estufa a 50°C, durante uma semana. Após esse período, o material foi pulverizado em moinho de facas, MF 10 *basic* IKA WERK. A massa pulverizada obtida foi de 77,58 g, a qual foi macerada com etanol P.A. (96%) e colocados, sob agitação em câmara fria protegido da luz. O solvente foi trocado a cada dois dias durante duas semanas. O extrato obtido foi filtrado em algodão e, em seguida, concentrado~~s~~ em evaporador rotatório sob pressão reduzida até a total remoção do solvente. Após completa evaporação do etanol o extrato foi devidamente pesado e parte solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 100 mg/ml, para posteriores testes biológicos, e armazenado em frasco âmbar, hermeticamente fechado e condicionado em freezer a – 20ºC (Fernandes *et al.*, 2013).

3.1.2.1 Obtenção das frações do extrato etanólico

Após a obtenção do EE 5 g do material foi submetido à partição líquido/líquido com solventes de polaridade crescente, utilizando-se ampola de decantação de 500 ml. O EE foi particionado adicionando cinco alíquotas de 100 ml dos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol (previamente hidratado), em ordem crescente de polaridade. Em seguida as frações particionadas foram submetidas a evaporador rotatório sob pressão reduzida até a secura (SANTI *et al.*,2014).

3.1.2.2 Análise do extrato etanólico

Para a análise do EE de *M. glomerata* foram realizados testes fitoquímicos qualitativos, abaixo discriminados, para verificação dos principais componentes presentes na amostra, seguidas de cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de sílica e análise em sistema CLAE-DAD-UV para as frações.

3.1.2.2.1 Testes fitoquímicos

Foram feitos testes fitoquímicos para: alcaloides, catequinas, fenóis e taninos, cumarinas, flavonoides e saponinas. A prospecção química seguiu a metodologia descrita no Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (Barbosa, 2004).

Para os alcaloides dissolveu-se 50 mg do EE seco em 5 ml de solução de HCl a 5%, seguiu-se com a filtração para quatro tubos de ensaio com cerca de 1 ml em cada tubo. Adicionou-se gotas dos seguintes reativos: Bouchard (iodeto de potássio e iodo em solução aquosa 2:1:100 g), Dragendorff (subnitrato de bismuto, iodeto de potássio, ácido nítrico concentrado e água destilada nas proporções 8g: 27 g: 20 ml: 100 g) e Mayer (cloreto de mercúrio, iodeto de potássio e água destilada na proporção de 1,35:5:100 g). Para as catequinas dissolveu-se 30 mg do EE seco em 3 ml de metanol. Em seguida foi realizada a filtração. Adicionou-se 1 ml de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 ml de HCl concentrado. Para fenóis e taninos foram dissolvidos 50 mg do EE seco em 5 ml de água destilada, filtrou-se e adicionou-se de uma a duas gotas de solução alcoólica de $FeCl_3$ a 1%. Para cumarinas foram dissolvidos 30 mg do EE seco em 5 ml de éter etílico. Concentrou-se em banho-maria até 0,5 ml. Aplicou-se gotas da solução etérea em papel de filtro, de modo a formar duas manchas de aproximadamente 1 cm cada. A uma destas manchas juntou-se uma gota de solução de NaOH a 1 N. Cobriu-se metade da mancha com papel escuro e a outra metade foi exposta a luz ultravioleta. Para os flavonoides dissolveu-se 100 mg do EE seco em 10 ml de metanol. Filtrou-se. Foram adicionadas cinco gotas de HCl concentrado e raspas de magnésio. Para saponinas espumídicas foram dissolvidos 50 mg do EE seco em 5 ml de água destilada. Em seguida, diluiu-se para 15 ml e agitou-se vigorosamente durante 2 min em tubo fechado.

3.1.2.2.2 Cromatografia em camada delgada

O EE e suas respectivas partições (2 g) foram solubilizados em metanol (1 ml) e submetidas a cromatografia em camada delgada em placa de sílica UV 254 Macherey-Nagel com metodologias propostas por Wagner e Bladt (2001), vide Quadro 1, para verificar a presença de flavonoides e saponinas.

3.1.2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

As condições de análise do EE no sistema CLAE-DAD Shimadzu LC 20A Prominence (kyoto, Japan), foram: coluna analítica Kromasil® 100 5C18 (250 mm x 4,6 mm) com pré-coluna Kromasil® 100 5C18 (10 mm x 4,6 mm); eluição em gradiente utilizando como fase móvel H_2O Tedia® grau HPLC (A) e Acetonitrila Tedia® grau HPLC (B): 5% (B) isocrático por 5 min, 5% - 100% (B) por 45 min, isocrático 100% (B) por 10 min; total de 60 min; fluxo de 1,0 ml/min; volume de injeção 10 µl, temperatura ambiente 23ºC.

Quadro 1– Metodologias cromatográficas propostas por Wagner e Bladt

Sistema	Solventes	Proporção (V/V)	Revelador	Indicação
1	Cloroformio/ácido acético glacial/metanol/água	64:32:12:8	Anisaldeído sulfúrico e Liberman-Burchard	Saponinas
2	Acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água	100:11:11:26	NP-PEG e reativo citro-bórico.	Flavonoide

Legenda: Sistemas de eluição indicados para detecção de saponinas e flavonoides.
Nota: O sistema 1 utilizou como revelador o anisaldeído sulfúrico e Liberman-Burchard indicado para revelação de saponinas. No sistema 2 foi usado NP-PEG e reativo citro-bórico indicado para revelação de flavonoides.
Fonte: A autora, 2019.

3.2 Cultura celular

No presente estudo, foram utilizadas linhagens celulares leucêmicas humanas (Jurkat e K562) e tumorais A549 (adenocarcinoma de pulmão), MCF7 (adenocarcinoma de mama) e PC3 (adenocarcinoma de próstata); além das linhagens não-tumorais RAW 264.7 (macrófago murina) e VERO (originária de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*); todas do banco de células do Departamento de Bioquímica – Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (LIABPPN).

As células A549, K562, Mcf-7 e Jurkat foram cultivadas em meio RPMI 1640 (SIGMA), contendo penicilina (*SIGMA*), 70 mg/l, e estreptomicina (SIGMA), 100 mg/l,

suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As célula RAW264.7 e VERO foram cultivadas em meio DMEM (SIGMA) contendo penicilina (SIGMA), 70 mg/l, estreptomicina (SIGMA), 100 mg/l e $NaHCO_3$ (MERCK) 3,7 g/l, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

Todas as células foram cultivadas, na densidade 1 x 10^5 células/ml, em seus respectivos meios de cultura, em garrafas de plástico estéreis de 75 cm² e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2. Foram realizadas passagens a cada 2-3 dias, sendo as células utilizadas nos experimentos até a 20ª passagem. As células em suspensão foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) com pH 7,4 (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 e 1,5 mM KH_2PO_4), centrifugadas e suspensas em meio novo com 10% de SFB. As células que crescem aderidas (A549, Mcf-7 e VERO) foram submetidas à tripsinização. A monocamada celular, semiconfluente, foi lavada duas vezes com PBS estéril a 37ºC. Após a lavagem foi adicionada a solução de tripsina (0,2%) EDTA (0,02%) e incubou-se as culturas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 até que as células soltassem da garrafa. A inativação da tripsina foi efetuada com meio de cultura acrescido com 10% de SFB.

As subculturas de RAW 264.7 foram obtidas por raspagem mecânica com auxílio de um raspador de plástico. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. Em seguida, adicionou-se meio DMEM com 10% de SFB. Todas as células foram contadas em câmara de Neubauer e mantidas nas garrafas de cultura a $5x10^5$células por ml.

3.3 Atividade antineoplásica

A atividade antineoplásica foi avaliada através de três metodologias: o ensaio de MTT (Mosman1983), o ensaio de exclusão por Azul de Tripam (RENZI *et al.,* 1993; BARILE, 1994; AVELAR-FREITAS *et al*, 2014) e avaliação do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo. Estes últimos foram realizados somente com a linhagem mais sensível a metodologia do MTT.

3.3.1 Citotoxicidade pelo ensaio de MTT

O ensaio de MTT é um método amplamente utilizado para determinar viabilidade celular *in vitro.* O método consiste na redução mitocondrial do sal [3- (4,5 – dimetil – 2 – tiazolil) 2,5 – difenil – 212 tetrazólio] MTT em cristais de formazan por desidrogenases mitocondriais. A quantidade de cristais de formazan (de cor azul violeta) produzida, após dissolução, é mensurada espectrofotometricamente. A intensidade da cor é proporcional ao número de células com respiração ativa, ou seja, células viáveis (MOSMAN, 1983).

Neste ensaio, adiciona-se às culturas celulares, contendo ou não os produtos fitogênicos, a solução de MTT (5 mg/ml) durante 2 h, a 37°C, no escuro. Após este tempo, os cristais de formazan formados são dissolvidos na solução SDS 10% contendo HCl 0,01N. A taxa de sobrevivência foi mensurada em comprimento de onda de 570 nm. Os valores de viabilidade celular correspondente a cada condição são expressos em porcentagem relativa à absorvância determinada nas células controle, que é considerada 100%.

3.3.2 Citotoxicidade pelo ensaio de exclusão de azul de tripam

Este método fundamenta-se em avaliar a integridade da membrana celular. O azul de tripam é um corante vital cuja reatividade se deve ao fato do cromóforo ser negativamente carregado. Logo não é capaz de interagir com as células a menos que a membrana celular esteja danificada. Assim as células viáveis são capazes de excluir o corante e manter aspecto translúcido enquanto as não viáveis apresentam coloração azulada (RENZI *et al.,* 1993; BARILE, 1994; AVELAR-FREITAS *et al,* 2014).

As células Jurkat foram incubadas, na densidade de 5 x 10^5 por ml, em placas de 24 poços tratadas ou não com diferentes concentrações (5, 50, 100 e 200 µg/ml) de extrato etanólico bruto de *M. glomerata* em um período de 72 h, a 37ºC em atmosfera úmida com 5% de CO_2. Após esse período, as células em suspensão foram diluídas (1:1) em solução de azul de tripam. A contagem para determinar o número de células viáveis e inviáveis foi feita em câmara de Neubauer usando o microscópio ótico (RENZI *et al.,* 1993; BARILE, 1994, AVELAR-FREITAS *et al*., 2014)

Foram realizados três ensaios independentes em triplicata. A proliferação e a viabilidade celular das células tratadas ou não com a *M. glomerata* foram expressas em porcentagem considerando a quantidade total de células (viáveis e não viáveis) como 100%. A taxa de mortalidade foi obtida pela porcentagem de células não viáveis (coradas de azul).

3.3.3 Avaliação do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo

3.3.3.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia utilizada para o estudo morfológico, fenotípico e funcional de células suspensas em um fluido. Possui capacidade singular para analisar diversos parâmetros simultaneamente em uma única célula. Sendo assim, quando se deseja realizar análise multiparamétricas em biologia celular, estudos de avaliação funcional de populações celulares, conteúdo de DNA, apoptose, citotoxicidade, expressão de receptores, produção de citocinas, a citometria de fluxo se constitui ferramenta de análise extremamente importante (FIOCRUZ, 2018).

3.3.3.2 Ciclo celular utilizando o marcador fluorescente iodeto de propídio

Nessa metodologia foi utilizado o marcador fluorescente iodeto de propídio (PI) que se intercala ao DNA (RIEGER, *et al*., 2011; POPMPILHO *et al., 2013*).

As células Jurkat foram incubadas em meio RMPI 1640 com 10% de soro fetal bovino, na densidade de 1 x 10^5 células por ml, em garrafas de cultura de 75 cm^2, tratadas ou não com diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/ml) de extrato etanólico bruto de *M. glomerata* diluído em 0,1% DMSO em um período de 72 h, a 37ºC em atmosfera úmida com 5% de CO_2.

Para o grupo controle negativo as células foram incubadas ou não à concentração de 0,1% de DMSO, a fim de avaliar a interferência do DMSO na análise do ciclo celular. Como

controle positivo as células foram incubadas com o composto Etoposídeo na concentração de (0,5 µM), sob as mesmas condições de incubação do extrato.

Após esse período, as células foram diluídas (1:1) em solução de azul de tripam e contadas em câmara de Neubauer usando o microscópio óptico para determinar a viabilidade celular. Alíquotas com $1x10^6$ células de cada amostra (controle e concentrações do extrato) foram centrifugadas a 3000 rpm por 3 min. Em seguida, o sedimento celular foi suspenso em 500 µl de tampão citrato (43 mM, pH 8,2) contendo PI (50 µg/ml) e triton X-100 (0,3%), para promover a permeabilização das células e, consequentemente, facilitar a marcação dos ácidos nucleicos pelo PI. As células foram incubadas por 15 min ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Logo em seguida foi feita a hidrólise do RNA em suspensão, adicionando 500 µl de solução de enzima RNAse (100 µg/ml, em tampão citrato 43 mM e pH de 8,2), para garantir a marcação exclusiva de DNA. Na sequência, as amostras foram incubadas por mais 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido este tempo, os núcleos das células foram analisados por citometria de fluxo, sendo adquiridos 10.000 eventos de cada amostra. Os núcleos foram analisados inicialmente pelo tamanho (Forward Scatter – FSC) e intensidade de fluorescência do PI (detectado pelo canal FL-2, que permite capitação de fluorescência na faixa de 585 $\pm$ 15 nm), através do software Flowjo 10 v.

Foram realizados três ensaios independentes em triplicata para determinar como a atividade citotóxica encontrada no EE estava afetando o ciclo celular.

3.3.3.3 Análise de apoptose por marcação com anexina-v

Anexinas constituem uma família de proteínas cálcio-dependentes fosfolipídio-ligantes, abundantes em organismos eucarióticos e intrinsicamente envolvidas na transdução de sinal. A anexina-V tem afinidade preferencial por fosfatidilserina (PS), que é externalizada em células que estão entrando em apoptose.

As células Jurkat foram incubadas, na densidade de 1×10^5 células por ml, em garrafas de cultura de 75 cm^2, contendo meio RMPI 1640 com 10% de soro fetal bovino, tratadas ou não com diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/ml) de extrato etanólico bruto de *M. glomerata* em um período de 72 h, a 37ºC em atmosfera úmida com 5% de CO_2.

Para o grupo controle negativo as células foram incubadas ou não com 0,1% de DMSO, a fim de avaliar sua interferência na apoptose por marcação com anexina-V. Como

controle positivo as células foram incubadas com o composto Etoposídeo na concentração final de 0,5 µM sob as mesmas condições de incubação do extrato.

Após esse período, as células foram diluídas (1:1) em solução de azul de tripam e contadas em câmara de Neubauer usando o microscópio ótico para determinar a viabilidade celular. Foram realizadas alíquotas equivalentes a $1x10^6$ células de cada uma das concentrações testadas. As células foram centrifugadas a 3000 rpm por 3 min. Para lavagem as células foram suspensas em 500 µl de tampão PBS (pH 7,4) e submetidas a nova centrifugação (3000 rpm /3 min).

Após a lavagem e descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 µl de tampão de ligação para ressuspensão do sedimento celular (Hepes 10 mM NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$) e 100 µl de cada suspensão das amostras foram transferidos para o tubo de citometria. A seguir foram adicionados 2,5 µl de Anexina V conjugada a FITC e incubando-se por 15 min em temperatura ambiente na ausência de luz. Após este período foram adicionados 200 µl de tampão de ligação para lavagem das células. Centrifugou-se 3000 rpm/3 min e após descartar o sobrenadante foi adicionado 2,5 µl de iodeto de propídio (20 µg/ml), e mais 500 µl de tampão de ligação para realizar a leitura por citometria de fluxo. Os dados de tamanho celular (FSC), complexidade celular (SSC), a fluorescência da AnexinaV-FITC (no canal FL-1, faixa de 535 $\pm$ 15 nm), e a fluorescência do PI (no canal FL-2, faixa de 570 $\pm$ 10 nm) foram obtidos em Citômetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter) em até 1 h após a marcação. As células marcadas foram mantidas em uma temperatura de 2 a 8 °C e no escuro. A análise dos dados foi realizada pelo software Flowjo V10.

3.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

3.4.1 Ensaio de NO

O potencial anti-inflamatório do OE e do EE de *M. glomerata* foi avaliado através de seu potencial de diminuição *in vitro* da produção de nitrito, intermediário do óxido nítrico (NO), o qual é um importante mediador inflamatório. A quantificação do nitrito foi mensurada no sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS a 1 µg/ml e tratados com as amostras de *M. glomerata* nas concentrações de 50 e 100 µg/ml pela

reação de Griess (GRIESS, 1879). Nesta reação, o nitrito formado reage com o ácido sulfanílico, em condições ácidas e na ausência de luz, formando um cátion diazônico. Este cátion, por sua vez, reage com o N-naftiletilenodiamina formando um composto de coloração violeta que pode ser quantificado por espectrometria no $\lambda_{máx}$ de 550 nm (TSIKAS, 2007).

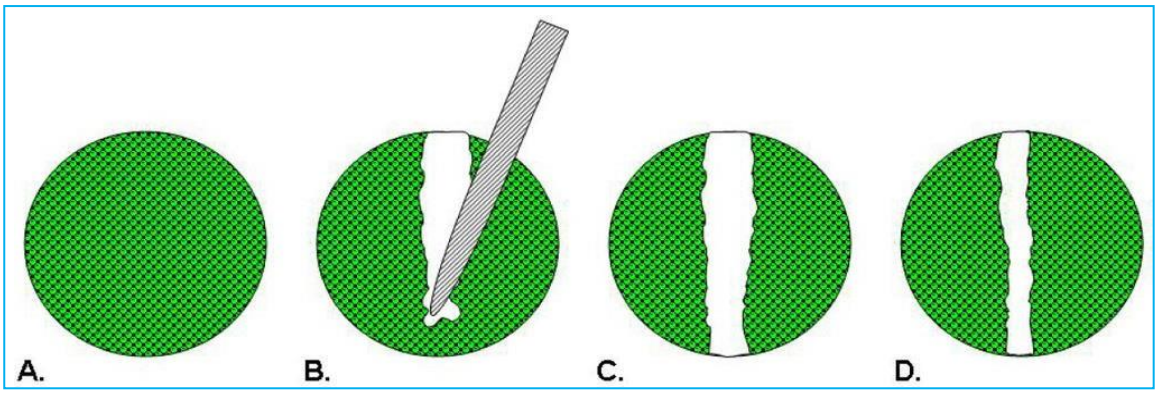
Para este ensaio, as células foram contadas em câmara de Neubauer, diluídas ($1x10^6$/ml), transferidas para placas de 96 poços (100 µl/poço) e mantidas a 37ºC, 5% de CO_2 e 95% de umidade por 24 h para que as células pudessem aderir antes da realização do experimento. Após este período as células RAW 264.7 foram estimuladas com LPS a 1 µg/ml, tratadas ou não (controle) com diferentes concentrações das amostras e novamente incubadas a 37ºC, 5% de CO_2 e 95% de umidade (volume final 200 µl/poço). Após 24 h, 100 µl do sobrenadante de cada poço foram retirados e transferidos para outra microplaca de 96 poços, onde foram adicionados 50 µl de ácido sulfanílico (10 mg/ml). A reação ocorreu durante 10 min ao abrigo de luz e após esse período, foram adicionados 50 µl de N-naftiletilenodiamina (1 mg/ml). Após mais 10 min de incubação, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a placa foi lida em leitor de microplacas a 550 nm. A curva padrão foi construída utilizando uma solução de nitrito de sódio (0,78 mM – 100 mM). Os resultados foram calculados a partir do coeficiente de extinção específico obtido na curva padrão e expressos em concentração de nitrito ou percentual de inibição da concentração de nitrito, em relação ao controle.

3.4.2 Ensaio *Wound Healing*

As células RAW 264.7 foram plaqueadas na densidade $1x10^6$células por/ml num volume de 500 µl/poço em meio DMEM 10% SFB. Após 24 h, retirou-se o meio, adicionou-se Mitomicina C a 5 µg/ml e a placa foi incubada por 2 h. A Mitomicina C foi retirada, e os respectivos poços foram lavados com PBS pH 7,4. Foi criada uma “ferida” na monocamada celular, com o uso de uma ponteira, como mostra a Figura 6, e as células foram lavadas novamente com PBS para retirar as células soltas. Em seguida, fez-se a captura das imagens representando o tempo zero (T_0). As células foram tratadas ou não (controle) com OE e EE, nas concentrações de 50 e 100 µg/ml, estimuladas ou não (controle negativo) com LPS. Após fazer a ferida fez-se a captura das imagens representando o tempo zero. Após 24 h, foram

capturadas novas imagens dos respectivos pontos nos poços (T_{24}), para comparar com o tempo zero e observar, qualitativamente, se houve ou não migração celular.

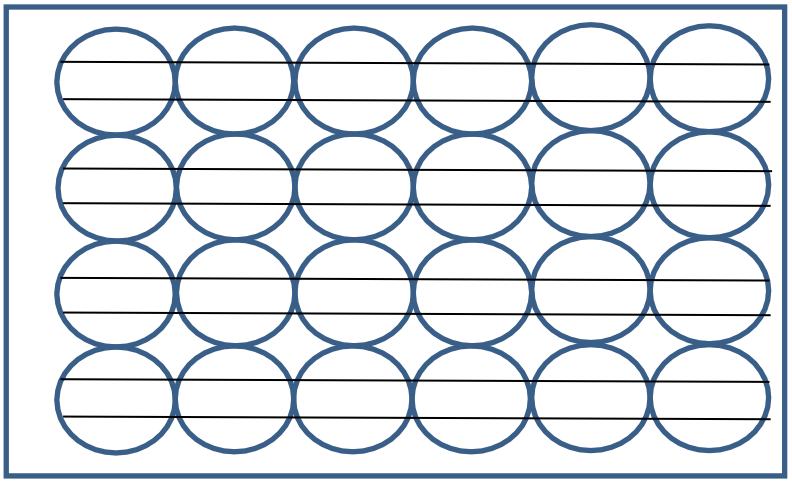
Figura 6 – Migração celular: metodologia do ensaio de *Wound Healing*



Legenda: A. 5x105 células foram incubadas com meio completo por 24h a 37ºC e 5% CO2;
B. Faz-se uma "ferida" com uma ponteira de pipeta automática, estabelecendo um caminho sem células.
C. Tirou-se foto no tempo 0h em dois pontos da placa e incubou-se por 24 h a 37ºC e 5% CO2;
D. Fotografou-se novamente nos mesmos dois tempos da placa.
Nota: A migração representa a área de fechamento da " Ferida" em relação ao tempo de 0 h
Fonte: HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L, 2011.

Para assegurar que as fotografias fossem realizadas na mesma região, tempo 0 h e tempo 24 h, com o auxílio de uma régua foram tracejados dois riscos horizontais na placa de 24 poços antes que as células fossem semeadas como mostra a Figura 7. Após terem sido feitas as "feridas" as fotos foram tiradas abaixo da linha superior e acima da linha inferior.

Figura 7 – Modelo de Placa



Legenda: Os traços horizontais devem ser feitos no verso da placa antes de semear as células

Nota: Após 24 h faz-se a " ferida" e fotograf-se abaixo da linha superior e acima da linha inferior.

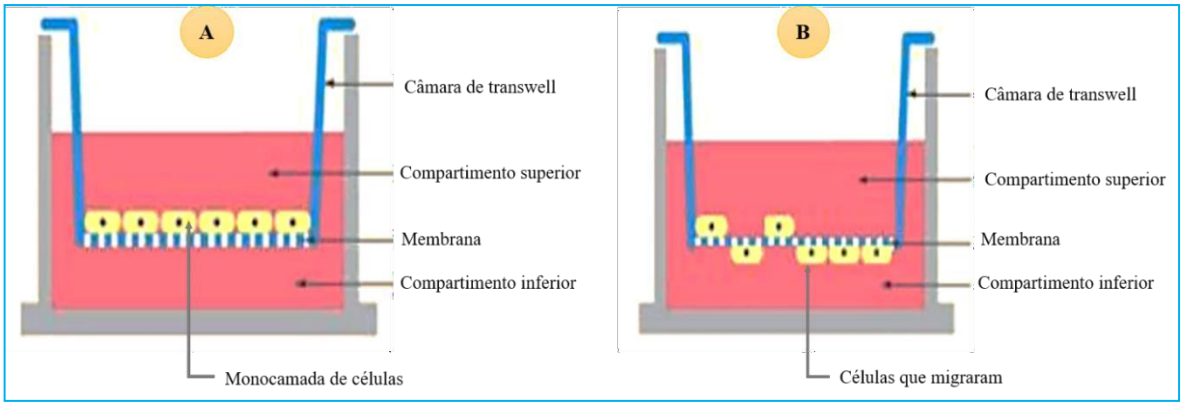
Fonte: A autora, 2019.

3.4.3 Ensaio de Boyden

O ensaio de *Boyden* (GLYNN *et al.*, 2008), é um modelo *in vitro* que mimetiza uma inflamação aguda, onde se utiliza uma placa de cultura de 24 poços e insertos de *transwell*, ou câmara de *Boyden*, formando um sistema com câmara superior e câmara inferior. Para analisar os efeitos biológicos da *M. glomerata* sobre a migração celular, as células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 24 poços, por 24 h, na densidade de $1x10^6$ cels/ml em um volume de 500 µl/poço de meio DMEM 10% SFB para permitir a aderência. Após 24 h, as células foram tratadas ou não (Controle) com OE e EE, nas concentrações de 50 e 100 µg/ml, estimuladas ou não (controle negativo) com LPS, e incubadas novamente por 24 h em estufa a 37ºC, 5% de CO_2. Decorrido este tempo, as células foram soltas da placa, contadas e inseridas nos insertos do *transwell* de 8 µm de diâmetro. A migração foi induzida criando um gradiente de soro. Para tal, na câmara inferior ao *transwell* foi colocado 600 µl de meio com 10% SFB, enquanto na câmara superior colocou-se 200 µl de suspensão celular, em meio 2% de SFB, na densidade de $2,5x10^5$cels/ml, como é possível observar na Figura 8. O sistema foi incubado por 3 h a 37ºC em estufa de CO_2 a 5%. Em seguida, o meio foi removido do compartimento superior do *transwell* e os insertos foram retirados dos poços e lavados com PBS (pH 7,4). Para revelar as células que migraram, estas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 2 min, e permeabilizadas com metanol 100% por 20 min. As células

foram coradas com Panótico, seguindo orientação do fabricante. As imagens das células que migraram foram capturadas por microscópio ótico de luz invertida. Foram capturadas imagens de 5 campos de cada poço. Os campos foram fotografados comparando os insertos com relógio analógico. Os campo 1, 2 3 e 4 correspondem respectivamente a 12 h, 3 h, 6 h e 9 h, enquanto o campo 5 corresponde ao centro do poço onde o ponteiro estaria fixado. A seguir Figura 8 indicando o modelo da câmara de *Boyden.*

Figura 8 – Modelo da câmara de *Boyden*



Legenda: Em **A** as células são adicionadas no compartimento superior da câmara de *Boyden (transwell).*Em **B** vê-se as células que migraram.

Nota: Em **A** as células são adicionadas no compartimento superior da câmara de *Boyden (transwell),* em meio de cultura com 2% de SFB. A membrana de 8 µm da câmara de *Boyden* separa o compartimento superior do inferior, o qual contém o meio de cultura com 10% SFB, formando um gradiente de concentração (quimioatraente) de SFB entre os dois compartimentos. Em **B** vê-se as células que migraram

Fonte: SANTOS, 2013.

3.5 Análise estatística

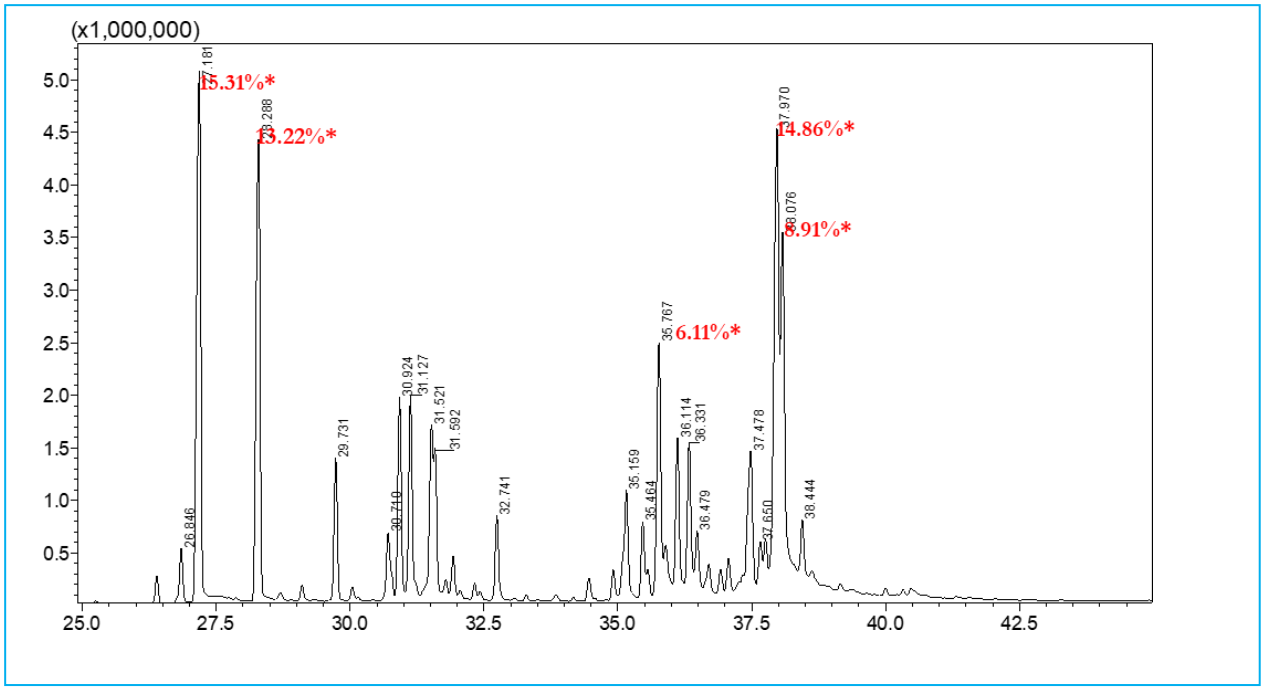
Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média, exceto para a determinação do IC_{50} (concentração que reduz 50% da viabilidade celular em relação ao grupo controle). Esse dado foi apresentado como média geométrica, seguida de seu respectivo limite de confiança em nível de 95%, por método de regressão linear do programa *Graph Pad Prism.* Os dados foram submetidos a ANOVA e ao pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ ou menos foram considerados como indicativos de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil cromatográfico do óleo essencial

O perfil cromatográfico do OE de *M. glomerata* obtido por CG – MS, representado na Figura 9, possibilitou a identificação de 21 componentes, sendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos *β*-Elemeno (15,31 %) e *β*-Cariofileno (13,22 %), e os sesquiterpenos oxigenados: kongol (14,86 %), 7-epi-α-eudesmol (8,91 %) e Guaiol (6,11 %), os predominantes na sua composição. A Tabela 1 mostra o tempo de retenção (TR), o índice de retenção calculado (I.R. Calc); indice de retenção na literatura (I.R. Lit) e as substâncias identificadas (n.i).

Figura 9 – Perfil cromatográfico do OE de *M. glomerata.* obtido por CG – EM



Legenda: Sesquiterpênicos *β*-Elemeno (15,31 %) e *β*-Cariofileno (13,22 %), e os sesquiterpenos oxigenados: Guaiol (6,11 %), kongol (14,86 %) e 7-epi-α-eudesmol (8,91 %), os predominantes na sua composição.

Nota: Perfil cromatográfico do OE de *M. glomerata* obtido por CG – MS representando a identificação de 21 componentes.

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 1 – Identificação dos constituintes do OE por CG-EM

Substâncias	T. R.[a]	Teor %	I.R. Calc.[b]	I.R. Lit.[c]
1. n.i.[d]	26.85	0.95	1384	-
2. *β*-Elemeno	27.18	15.31*	1391	1391
3. *β*-Cariofileno	28.29	13.22*	1417	1419
4. α-Humuleno	29.73	3.17	1451	1455
5. n.i.	30.71	1.63	1474	-
6. Germacreno D	30.92	4.74	1479	1485
7. *β*-Selineno	31.13	4.44	1484	1490
8. δ-Selineno	31.52	4.05	1492	1493
9. Biciclogermacreno	31.59	2.71	1494	1500
10. δ-Cadineno	32.74	1.72	1523	1523
11. Globulol	35.16	1.59	1583	1585
12. Viridiflorol	35.46	1.31	1590	1593
13. Guaiol	35.77	6.11*	1597	1601
14. Rosifoliol	36.11	3.57	1606	1600
15. n.i.	36.33	3.64	1612	-
16. n.i.	36.48	1.28	1616	-
17. Cubenol	37.48	4.32	1643	1647
18. δ-Cadinol	37.65	1.49	1647	1646
19. Kongol	37.97	14.86*	1656	1660
20. 7-epi-α-eudesmol	38.08	8.91*	1658	1664
21. Bulnesol	38.44	0.98	1668	1672
Total de constituintes identificados		92.50		
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		49.36		
Sesquiterpenos oxigenados		43.14		

Legenda: Em vermelho os constituintes predominantes na composição do OE de *M. glomerata*. Os sesquiterpênicos *β*-Elemeno (15,31 %) e *β*-Cariofileno (13,22 %), e os sesquiterpenos oxigenados: Guaiol (6,11 %), kongol (14,86 %) e 7-epi-α-eudesmol (8,91 %).

Nota: [a]Tempo de Retenção; [b]Índice de Retenção Calculado; [c]Índice de Retenção na Literatura; [d]Não identificado. *Substâncias majoritárias.

Fonte: A autora, 2019.

A família Myrtaceae apresenta como característica marcante a presença de cavidades oleíferas evidentes nos seus órgãos aéreos (DONATO; MORRETES, 2005, 2009; SERAFIM, 2006; FISHER, 2007; BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014). O rendimento obtido da extração do OE das folhas de *M. glomerata* foi de aproximadamente

0,17% em relação à biomassa fresca, o que está em conformidade com o descrito na literatura para espécies desta família.

Lopes (2008) encontrou rendimento constante nos meses de maio, julho e setembro, 0,14%, 0,13% e 0,18%, respectivamente. De acordo com Silva (2013), rendimentos superiores a 1% não são muito comuns nas espécies desta família, exceto para alguns óleos provenientes de algumas espécies do gênero *Eucalyptus* e os obtidos dos botões florais do cravo (*Syzygium aromaticum*), que chegam a alcançar teores de até 15% (CRAVEIRO,1981). Entretanto, Lopes (2008) no mês de janeiro, estação chuvosa, obteve o maior rendimento (1,16%) do OE para essa espécie.

Silva (2013) estudou a composição, o rendimento e o efeito biológico de três espécies da família Myrtaceae: *Myrcia myrtifolia* (DC), *Myrcia alagoensis* (O. Berg) e *Myrcia rostrata* (DC) e observou que o rendimento do óleo essencial para essas três espécies de Myrtaceae foi inferior a 0,6%. Portanto ao comparar os dados de Silva (2013), Serafim (2006) e Lopes (2008) com os encontrados no presente estudo é possível inferir que o rendimento do OE de *M. glomerata* é três vezes maior do que o encontrado em outras espécies dessa família, inclusive nas estações secas do ano.

Com relação à fitoquímica do óleo essencial, existe uma semelhança significativa entre os resultados obtidos neste estudo e os trabalhos descritos na literatura, tanto para a família Myrtaceae em geral, como para o gênero *Myrciaria* e a espécie *M. glomerata*. Tappin et al. (1998), ao estudar a composição do OE *Eugenia jambolana* (Myrtaceae), constataram a presença majoritária de β-cariofileno e α-humuleno. Em *Myrciaria tenella* foi descrita a presença majoritária de sesquiterpenos, com predomínio de β-cariofileno (APEL *et al.*, 2010). O OE de *Myrciaria cauliflora* é constituído de eudesmol e germacreno D e compostos fenólicos (DUARTE, 2012). Fischer (2007) afirmou que o OE *M. glomerata* é constituído, basicamente, de germacreno B, α-cadinol, β-elemeno e germacreno D e β-cariofileno. Lopes (2008) estudou a composição química do OE *M. glomerata M. glomerata* coletado nas quatro estações e encontrou oito componentes comuns: β-elemeno, γ-elemeno, δ-elemeno, germacreno B, óxido de cariofileno, α-humuleno, α-cadinol e α-eudesmol.

Ao comparar os dados obtidos nesse estudo com os da literatura foi possível inferir que a variação química nos óleos essenciais parece ser determinada por fatores ambientais (SIMÕES *et al.*, 2007; Lopes, 2008; Duarte, 2012).

4.2 Perfil Cromatográfico do Extrato Etanólico

A massa obtida da extração do EE das folhas de *M. glomerata* foi de 11,3875 g apresentando rendimento correspondente a, aproximadamente, 7,67% em relação à biomassa fresca e a 14,67% em relação a biomassa seca. Após a concentração das fases obteve-se 1,0454 g de fração em hexano (FrHe), 0,6113g de fração em diclorometano (FrDCM), 0,62 g de fração em acetato de etila (FrAc) e 0,72 g de fração em n-butanol (FrB) e 876 mg de resíduo aquoso (SANTI *et al.,* 2014).

Não foram encontrados na literatura dados do rendimento do EE para esta espécie. Entretanto, Serafim (2006), utilizando folhas e galhos da *M. glomerata,* obteve a massa de 48,72 g com rendimento de 12,18% para o extrato metanólico bruto e obteve massa de 110 g e rendimento de 6,5 % para o extrato acetônico. Serafim adotou duas metodologias de extração para o extrato metanólico bruto. Em uma das coletas as folhas e galhos foram macerados em metanol por sete dias em percolador seguido de filtração e secura em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Na segunda metodologia adotada por Serafim, a planta fresca foi macerada diretamente com acetona e posteriormente com metanol. Nesta metodologia Serafim obteve o rendimento 6,5% para o extrato acetônico e 3,6 para o extrato metanólico. e observou que o rendimento foi menor (3,6%) em uma das metodologias adotadas (SERAFIM, 2006), sugerindo, portanto, que a metodologia de extração pode interferir no rendimento.

Em relação ao rendimento das frações, Serafim relata apenas as FrHe (1,1 g), FrDCM (0,49 g), FrAc (0,84 g). O resultado obtido neste estudo é superior ao relatado por Serafim em relação as FrDCM equivalentes aos obtidos por Serafim em relação a FrHeA.

A metodologia adotada nesse estudo para obtenção do EE parece propiciar um rendimento superior ao relatado por Serafim (2006) para a mesma espécie.

4.2.1 Testes colorimétricos fitoquímicos do extrato etanólico

Na caracterização fitoquímica qualitativa do extrato etanólico de *M. glomerata* foi possível constatar a presença de classes de compostos químicos provenientes do metabolismo secundário da planta. Os resultados obtidos seguiram a metodologia descrita

no Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (Barbosa, 2004). A Tabela 2 mostra os resultados obtidos na triagem a partir do EE.

Tabela 2 – Perfil fitoquímico do EE de *M. glomerata*

Metabólitos secundários	**Resultados**
Alcaloides	+
Cumarinas	+
Compostos fenólicos	+
Flavonoides	+
Saponinas	+

Legenda: (+) = presença; (-) =
Nota: Os resultados foram considerados positivos seguindo a metodologia proposta no manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais (BARBOSA, 2004)
Fonte: A autora, 2019.

Entre as classes de metabólitos secundários pesquisados neste trabalho, cujos resultados estão apresentados na tabela 3, foi possível observar a presença de alcaloides, cumarinas, compostos fenólicos, flavonoides e saponinas.

Os testes realizados para alcaloides foram considerados positivos pois surgiram os precipitados característicos para cada reagente colorimétrico. No reativo de Bouchard houve o aparecimento de precipitado laranja-avermelhado, no reativo de Dragendorff, precipitado vermelho-tijolo e no reativo de Mayer precipitado branco.

Em relação aos compostos fenólicos qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativa de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + Solução de $FeCl_3$). A reação apresentou coloração verde indicativa da presença de taninos catéquicos.

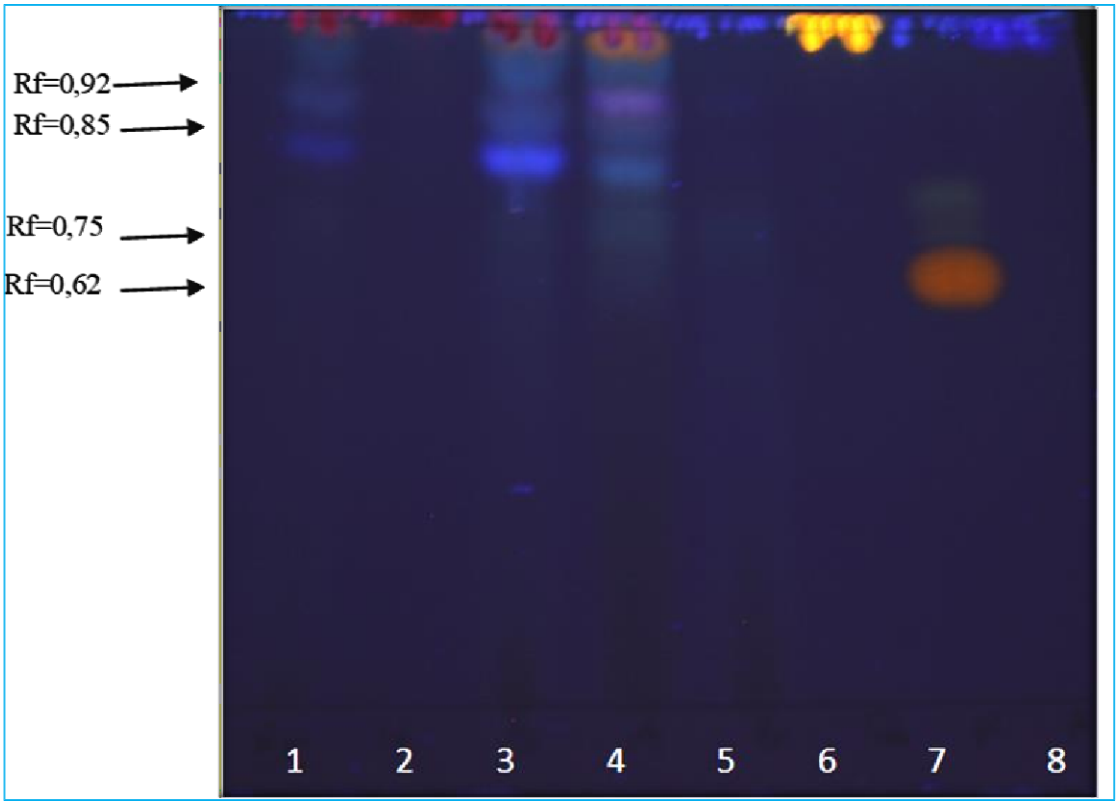
O teste para cumarinas apresentou fluorescência azul indicando reação positiva. Foi observado a coloração rósea na pesquisa de flavonoides o que indica a positividade da reação. A reação para saponinas foi considerada positiva porque a camada de espuma permaneceu estável por mais de meia hora.

4.2.2 Cromatografia em camada delgada

Conforme descrito no material e método foram feitas 15 placas cromatográficas em diferentes condições objetivando detectar a presença de metabólitos secundários.

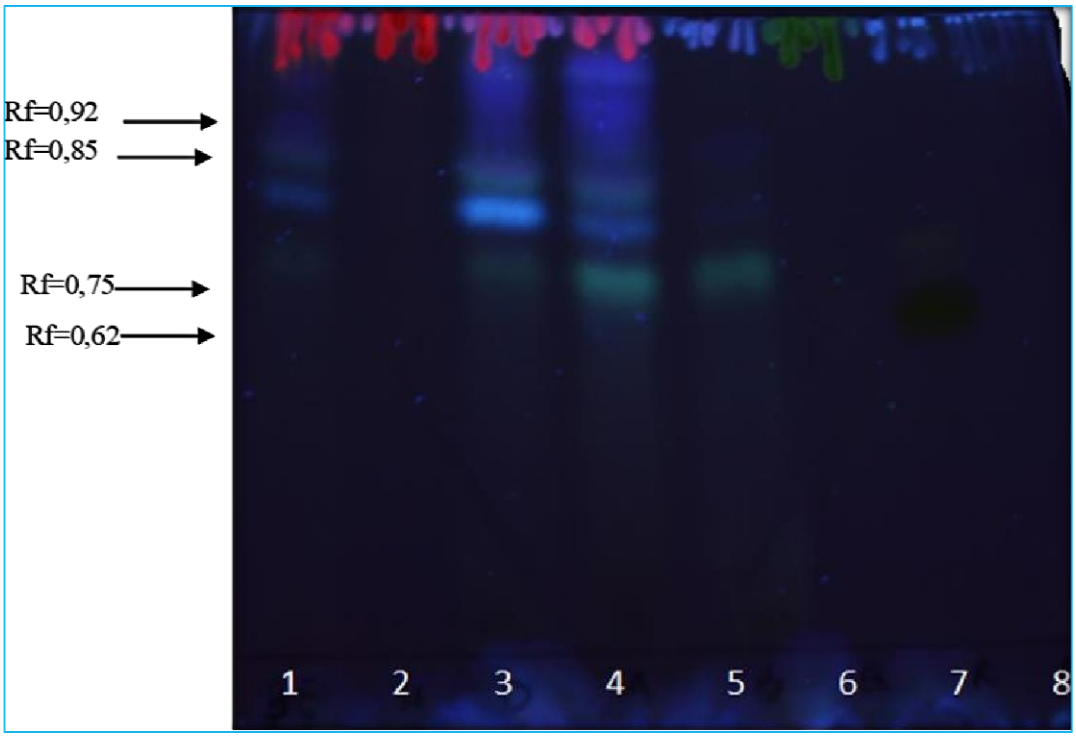
Nas placas cromatográficas das condições propostas para flavonoides e saponinas descritas por Wagner e Bladt (2001) puderam ser observadas manchas sugestivas da presença de flavonoides (Figuras 10 e 11) e saponinas (Figura12).

Figura 10 – Perfil cromatográfico para flavonoides do EE e frações de *M. glomerata* revelados por NP/PEG



Legenda: (1) EE, (2) FrHe, (3) FrDCM, (4) FrAc, (5) FrB, (6) quercetina, (7) rutina (Rf = 0,62), (8) ácido gálico. Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acétio glacial:água (100/11/11/26 v/v). Revelação: NP/PEG 4000, visualização em UV 365.
Nota: Condições propostas para flavonoides e saponinas descritas por Wagner e Bladt (2001)
Fonte: A autora, 2019.

Figura 11 – Perfil cromatográfico para flavonoides do EE e frações de *M. glomerata* revelados por reativo citro-bórico

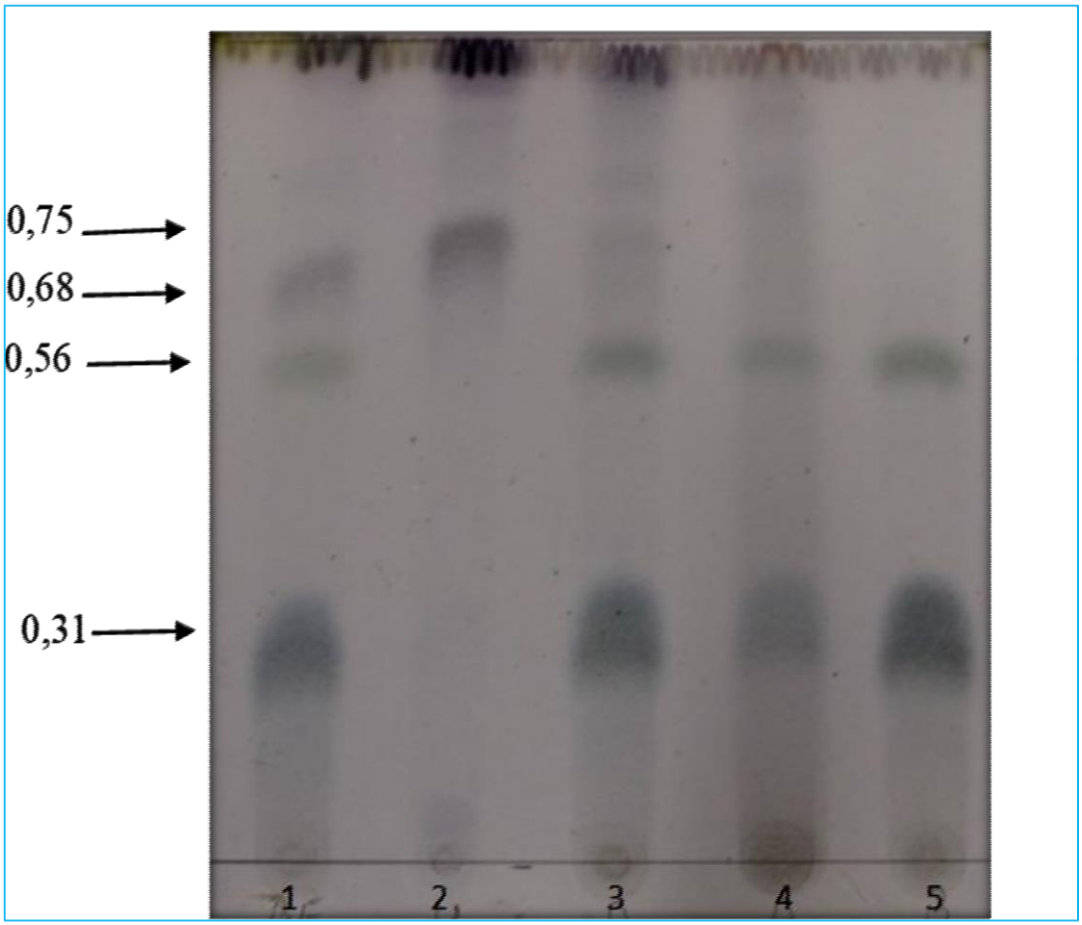


Legenda: (1) EE, (2) FrHe, (3) FrDCM, (4) FrAc, (5) FrB, (6) quercetina, (7) rutina (Rf = 0,62), (8) ácido gálico. Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico:ácido acétio glacial:água (100/11/11/26 v/v). Revelação: reativo citro-bórico, visualização em UV 365..
Nota: Condições propostas para flavonoides descritas por Wagner e Bladt (2001)
Fonte: A autora, 2019.

Foram observadas várias bandas amarelo-esverdeadas, com revelador NP/PEG indicativas da presença de flavonoides, especialmente na fração em acetato de etila (Figura 10). Os padrões quercetina e ácido gálico subiram até o *front* do solvente (amostras 7 e 8 da Figura 10 e 11, respectivamente). Nas frações em diclorometano e acetato observam-se manchas alaranjadas no *front* do solvente, sugerindo a ocorrência de flavonoides não-glicosilados.

O reativo citro-bórico permitiu a coloração de várias manchas semelhantes às observadas anteriormente, em tons esverdeados e azulados. Podem ser vistas também mais manchas, como no Rf = 0,75, que aparece também na fração butanólica. A rutina (Rf = 0,62) pode ser vista com uma cor mais escura.

Figura 12 – Perfil cromatográfico para saponinas do EE e frações de *M. glomerata* revelados por anisaldeído sulfúrico



Legenda: (1) EE, (2) FrHe, (3) FrDCM, (4) FrAc, (5) FrB. As regiões indicativas da presença de saponinas podem ser vistas como bandas de coloração azulada ou acastanhada (Rf = 0,31; 0,56; 0,68 e 0,75), observadas após a revelação com anisaldeído sulfúrico e aquecimento.
Nota: Condições propostas para saponinas descritas por Wagner e Bladt (2001)
Fonte: A autora, 2019.

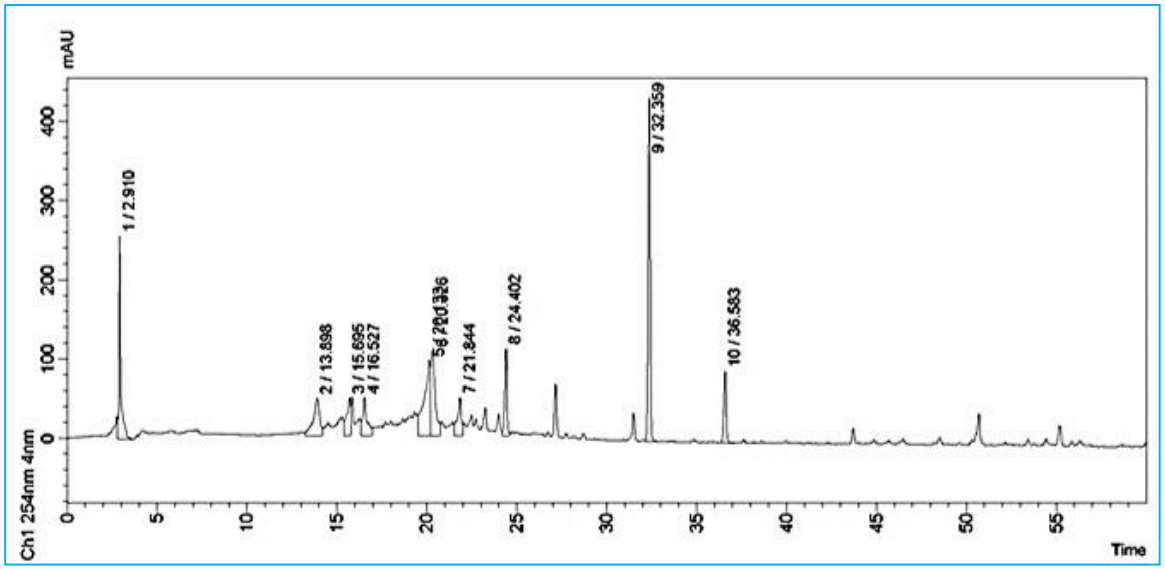
Os dados obtidos neste estudo coincidem com os descritos por Borges, Conceição e Silveira (2014) para as plantas do gênero *Myrciaria*. Os autores afirmam que as espécie contém vários componentes ativos, incluindo compostos fenólicos, como taninos, flavonóides, ácido elágico e antocianinas.

4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de diodo com ultravioleta visível

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência com ultravioleta visivel acoplada a detectores de diodo (CLAE – UV – DAD), Figura 13, mostra o perfil cromatográfico do EE de *M. glomerata* visto no comprimento de onda 254 nm. Os resultados aqui encontrados sugerem presença de flavonoides como é possível observar nos espectros de UV representados na Figura 14 e na Tabela 4, respectivamente.

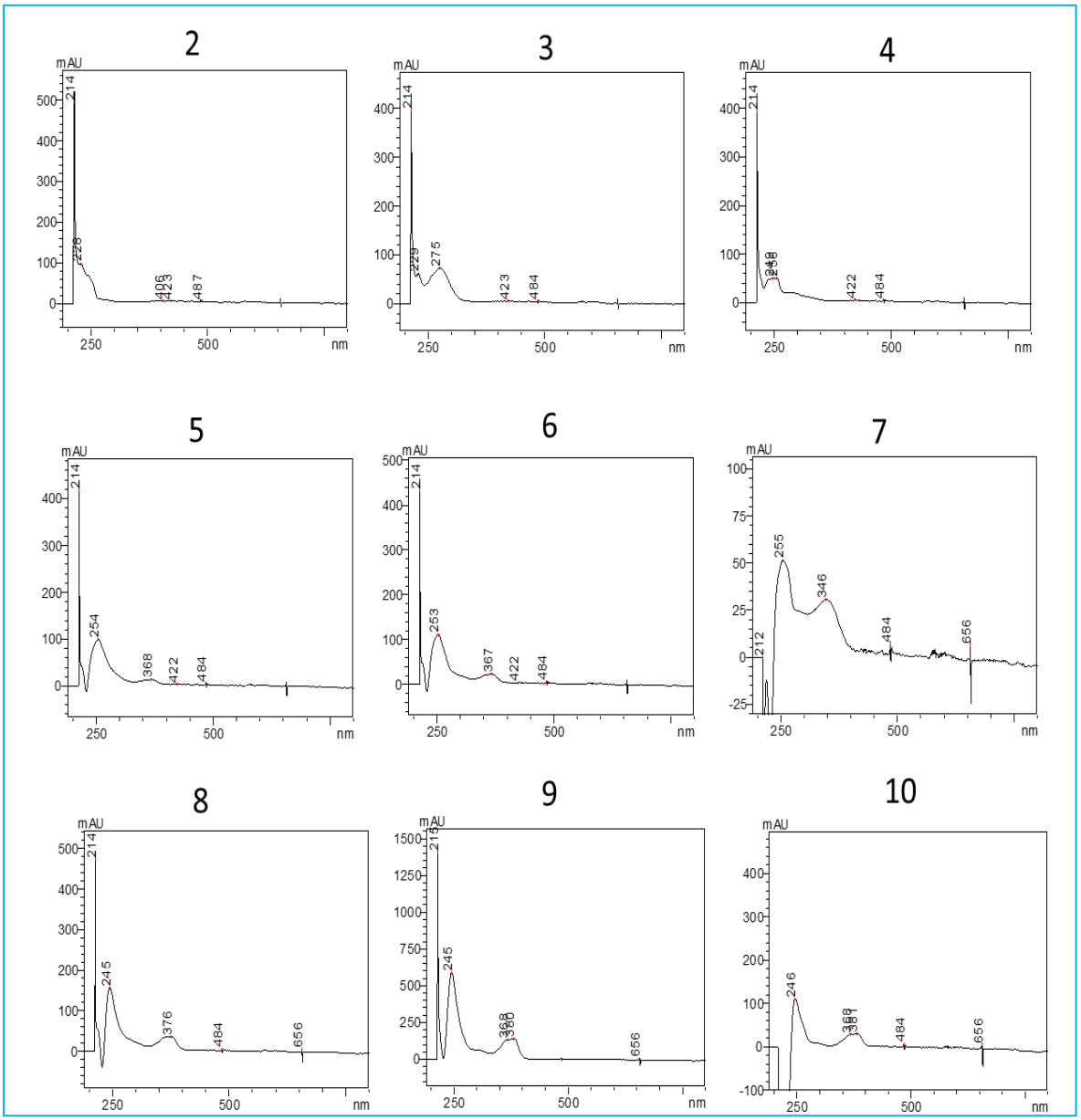
Os flavonóides são compostos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides presentes em abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (RODRIGUES, GONÇALVES; 2004; SIMÕES *et al.*, 2005, 2007).

Figura 13 – Perfil cromatográfico do EE de *M. glomerata* obtido por CLAE– DAD – UV observado em 254 nm



Legenda: Número do sinal/Tempo de retenção.
Nota: Varredura de espectros das substâncias presentes no EE de *M. glomerata*
Fonte: A autora, 2019.

Figura 14 – Varredura de espectro observada em UV das substâncias presentes no EE de *M. glomerata*



Legenda: Sinais 2-10, relativos ao cromatograma apresentado na Figura 13, obtido por CLAE – UV – DAD do EE de *M. glomerata*.

Nota: Varredura de espectro das substâncias presentes no EE de *M. glomerata* nos comprimentos de onda do UV – VIS (200 – 780 nm)

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 3 – Percentual relativo (%) dos constituintes do EE de *M. glomerata*, com visualização no UV em 254 nm

N	Tr	área	Área %	λ máx	Classe sugerida de substância
1	2,910	1648311	11,670	-	n.i
2	13,898	1143235	8,094	214; 226	Flavonoide
3	15,695	711304	5,036	214; 226; 275	Flavonoide
4	16,527	787751	5,577	214; 248; 250	n.i
5	20,133	2222390	15,734	214; 254	Flavonoide
6	20,326	1707628	12,090	214; 253	Flavonoide
7	21,844	729538	5,165	255; 346	n.i
8	24,402	922758	6,533	214; 245	Flavonoide
9	32,359	3444453	24,387	215;245; 368; 380	Flavonoide
10	36,583	807019	5,714	246; 368; 369	Flavonoide
Total		14124386	100,00		

Legenda: Sinais 2-10, relativos ao cromatograma apresentado na Figura 13, obtido por CLAE – UV – DAD do EE de *M. glomerata*. Os dados desta Tabela correspondem a varredura de espectro das substâncias presentes no EE de *M. glomerata* nos comprimentos de onda do UV – VIS (200 – 780 nm)

Nota: Observe que os principais componentes do EE parecem pertencer a classe dos flavonoides de acordo com o comprimento de onda máximo.

Fonte: A autora, 2019.

Os dados observados na análise cromatográficas por CLAE reforçam os previamente descritos tanto nos testes colorimétricos fitoquímicos quanto na CCD.

De acordo com Simões e colaboradores (2004) a espectroscopia no ultravioleta é a principal técnica tanto para a detecção quanto para o monitoramento da pureza de derivados flavônicos durante os processos de isolamento. Os flavonoides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, estabelecido pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção. A banda I ocorre entre 300-400 nm e a banda II ocorre entre 240-285 nm. Em flavonas a banda I aparece entre 304-350 nm e em flavonóis entre 352-385 nm, enquanto di-hidroflavonois, flavanonas e isoflavonas exibem uma banda I de baixa intensidade, geralmente aparece como ombro da banda II. Já as chalconas e auronas apresentam um espectro UV com uma banda I dominante e uma banda II relativamente pequena. Em chalconas vê-se a banda I com máximos entre 340-390, mas ocorre

frequentemente um pico entre 300-320 nm, enquanto a banda II das chalconas apresenta seu máximo entre 220-270 nm. As antocianinas e antocianidinas apresentam a banda I com máximo de absorção entre 465-550 nm e a banda II com sinal de baixa intensidade que ocorre entre 270-280 nm.

Serafim (2006) afirma que as partes aéreas de *M. glomerata* apresentam majoritariamente substâncias fenólicas, particularmente flavonoides e taninos, e ausência de alcaloides. Os achados desse estudo diferem dos encontrados por Serafim somente no que diz respeito aos alcaloides.

4.3 Avaliação da atividade antineoplásica

4.3.1 Citotoxicidade por MTT

O primeiro efeito biológico avaliado neste estudo foi a atividade antineoplásica, sob as linhagens celulares Jurkat e MCF-7, através da metodologia do MTT. Foi realizado um *screening* de tempo (24, 48 e 72 h) para essas linhagens, utilizando as concentrações de 50 µg/ml e 100 µg/ml do OE e EE, a fim de estabelecer o melhor tempo de atividade *in vitro* destes produtos extraídos de *M. glomerata*.

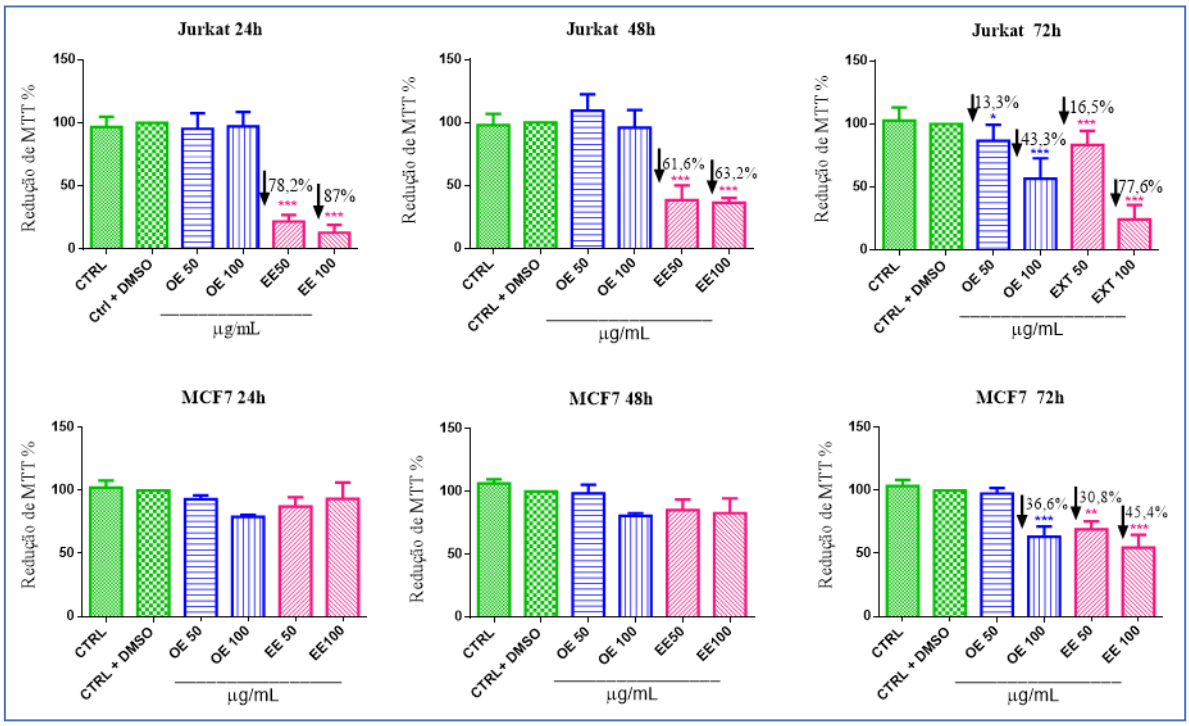
Tendo em vista que o DMSO foi o solvente utilizado na diluição dos produtos botânicos para todos os experimentos, este foi utilizado como controle celular, em que as células foram incubadas em meio de cultura com 10 % SFB e DMSO, na diluição equivalente à sua concentração nas amostras testadas (10 µM). O objetivo foi assegurar que o efeito biológico observado fosse decorrente da *M. glomerata*, e não do DMSO. Para isto, foi avaliada a toxicidade desse solvente sobre todas as linhagens testadas.

Também foi realizado o controle do MTT em relação a maior concentração das amostras tanto do extrato quanto do óleo. Neste, as amostras foram incubadas somente com meio a 10% de SFB e o MTT sem a presença de células. O objetivo foi averiguar se a amostra interfere na reação de MTT.

O DMSO tem sido utilizado desde 1959 como agente protetor nos processos de congelamento e descongelamento de células. Uma das diferenças entre o DMSO e outros compostos está na capacidade deste de solubilizar distintos tipos de substâncias (RODRIGUES *et al*., 2008; SOUZA, 2014).

A Figura 15 mostra que no tempo de 72 h mostrou foi mais expressiva a redução da viabilidade celular das duas linhagens testadas, quando comparados ao controle, o que determinou a sua escolha no protocolo de avaliação das outras linhagens celulares. Para a Jurkat o EE causou inibiu a viabilidade celular em aproximadamente 80% desde o tempo 24 h. O OE só induziu toxicidade a partir de 72 h. A redução foi de aproximadamente 13,3%, para a concentração de 50 µg/ml, e de 43,3% para concentração de 100 µg/ml. Em relação ao EE, foi observada uma diminuição da atividade redutora mitocondrial das células Jurkat nas concentrações testadas em todos os tempos de incubação (entre 16,5% a 77,6%). Na MCF-7, houve redução de viabilidade, nas concentrações testadas, somente em 72 h após o tratamento e o OE apresentou citotoxicidade apenas na concentração de 100 µg/ml (36,6%), enquanto o EE foi citotóxico para ambas as concentrações (30,8% e 45,4%, respectivamente). Não houve diferença no percentual de viabilidade nas duas linhagens nos poços controle e controle com DMSO.

Figura 15 – Citotoxicidade do OE e EE de *M. glomerata* sobre as linhagens celulares Jurkat e Mcf.7 nos tempos de 24, 48 e 72 h



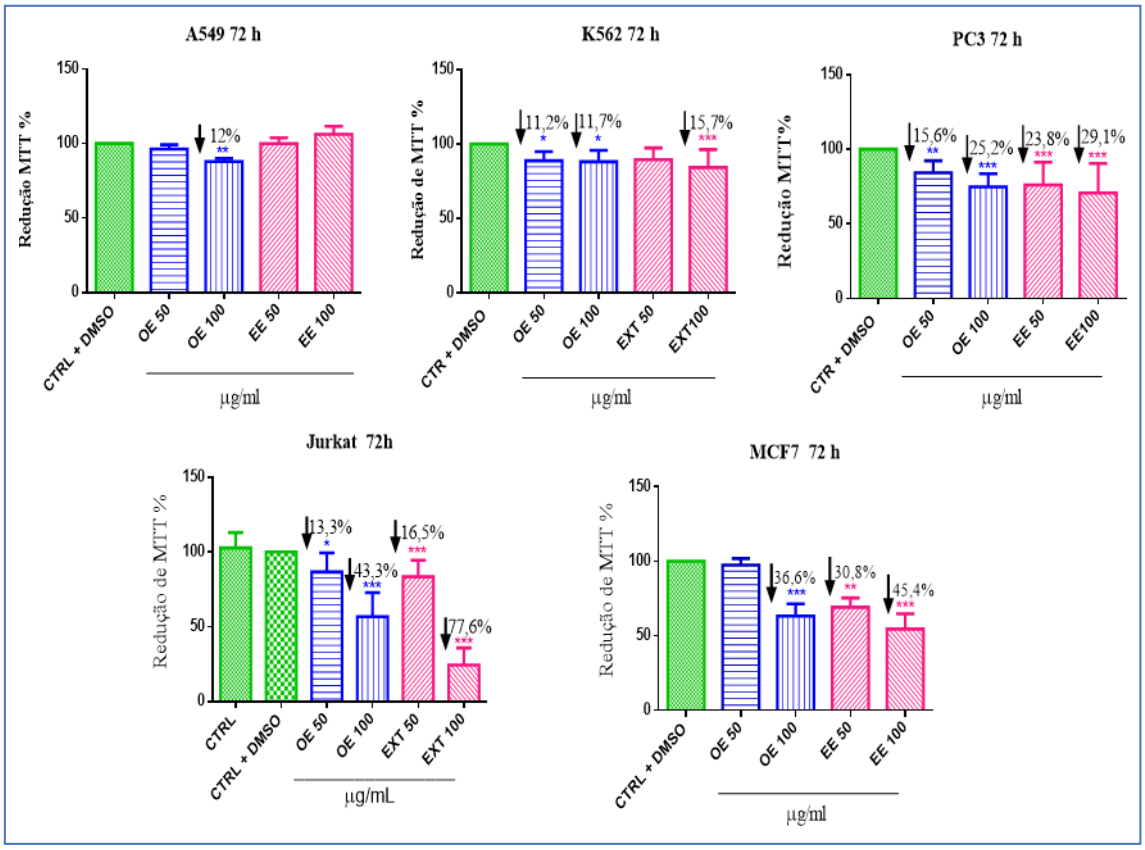
Legenda: As células Jurkat e Mcf.7 ($1x10^5$/ml) foram incubadas na ausência (controle) ou presença dos produtos naturais por 24, 48 e 72h, e a citotoxicidade foi determinada por ensaio de MTT. Os gráficos representam a média ± DP de três experimentos independentes. * p<0,05; *** p<0,001; em comparação com o controle de DMSO (*One way ANOVA* seguido de teste *Tukey).*

Nota: O OE em ambas as linhagens só induziu toxicidade a partir de 72h. Na linhagem Jurkat o EE induziu a citotoxicidade em todos os tempos testados. Na linhagem Mcf7 a inibição da viabilidade ocorre após 72 h.

Fonte: A autora, 2019.

Sendo assim, o tempo determinado para verificar a citotoxicidade celular foi de 72 h para as demais linhagens celulares. Os resultados exibidos na Figura 16 indicam que, no tempo de 72 h, houve diminuição na porcentagem de viabilidade celular em todas as linhagens estudadas.

Figura 16 – Citotoxicidade do OE e EE de *M. glomerata* sobre as linhagens celulares A549, K562, PC3, Jurkat e Mcf.7 no tempo de 72 h



Legenda: As linhagens celulares foram incubadas, na densidade de $1x10^5$/ml, na ausência (controle) ou presença dos produtos naturais 72 h, e a citotoxicidade foi determinada por ensaio de MTT. Os gráficos representam a média ± DP de três experimentos independentes. *p<0,05; ***p<0,001 em comparação com o controle de DMSO (*One way* ANOVA seguido de teste *Tukey)*.

Nota: Houve diminuição na porcentagem de viabilidade celular em todas as linhagens estudadas. A linhagem Jurkat foi a mais sensível.

Fonte: A autora, 2019.

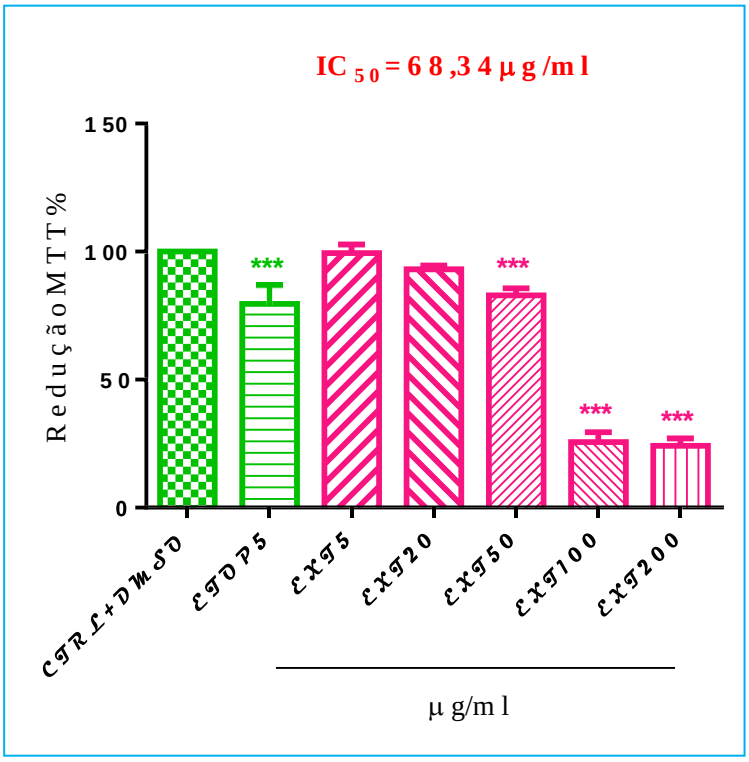
A linhagem celular A549 só foi sensível ao OE na concentração de 100 µg/ml cuja inibição foi de aproximadamente 12%. A linhagem K562 foi sensível tanto ao OE quanto ao EE. O OE diminiuiu a viabilidade celular da K562 em torno de 11% em ambas as concentrações testadas. Já o EE diminuiu em 15,7% a viabilidade celular da K562 somente na concentração de 100 µg/ml. A PC3 foi sensível ao OE e ao EE em ambas as concentrações

testadas apresentando inibição em torno de 15 a 25% para o OE e 23 a 29% para o EE. De todas as linhagens testadas, a mais sensível foi a linhagem Jurkat, cuja inibição variou de 13 a 43% para o OE e de 76,4 a 77,6% para o EE, para qual foi estabelecido o IC_{50}.

Para obtenção do IC_{50}, nos ensaios de citotoxicidade celular foram avaliadas seis concentrações 5, 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml do EE de *M. glomerata* em função do tempo de tratamento de 72 h para a Jurkat, vide Figura 17.

Os dados obtidos foram analisados pelo método de regressão linear, utilizando o *software GraphPad Prism* 6.0. O IC_{50} do EE encontrado para a Jurkat corresponde a concentração de 68,34 µg/ml.

Figura 17 – IC_{50} do EE encontrado para a Jurkat pelo método do MTT



Legenda: Para obtenção do IC_{50} foram avaliadas seis concentrações 5, 10, 20, 50, 100 e 200 µg/ml do EE de *M. glomerata* em função do tempo de tratamento de 72 h para a Jurkat

Nota: As células foram incubadas, na densidade de $1x10^5$/ml, na ausência (controle) ou presença dos produtos naturais 72 h, e a citotoxicidade foi determinada por ensaio de MTT. O gráfico representa a média ± DP de três experimentos independentes. *p<0,05; ***p<0,001 em comparação com o controle de DMSO (*One way* ANOVA seguido de teste *Tukey)*.

Fonte: A autora, 2019.

Dados da literatura comprovam que os óleos essenciais e/ou seus componentes isolados, como por exemplo, o *β*-cariofileno e o guaiol (ALCÂNTARA, 2010; YANG, Q. *et al.*, 2016; YANG, X. *et al.*, 2018), obtidos de diversas espécies, demonstraram atividade supressora tumoral, quando testados em linhagens tumorais humanas, incluindo câncer de mama e leucemias, dentre outras (ROSA *et al.*, 2016).

O *β*-cariofileno foi um dos constituintes majoritários do OE de *M. glomerata* e possui diversas atividades biológicas descritas, tais como, anti-inflamatória, antialérgica, anestésica local, antifúngica e anticarcinogênica (ALCÂNTARA, 2010).

O guaiol, um álcool sesquiterpeno, está presente em outras espécies do gênero *Myrciaria* tem sido descrito na literatura, como um componente da maioria das plantas medicinais, e por apresentar potencial antibacteriano e atividade antitumoral (YANG, Q. *et al.*, 2016; YANG, X. *et al.*, 2018).

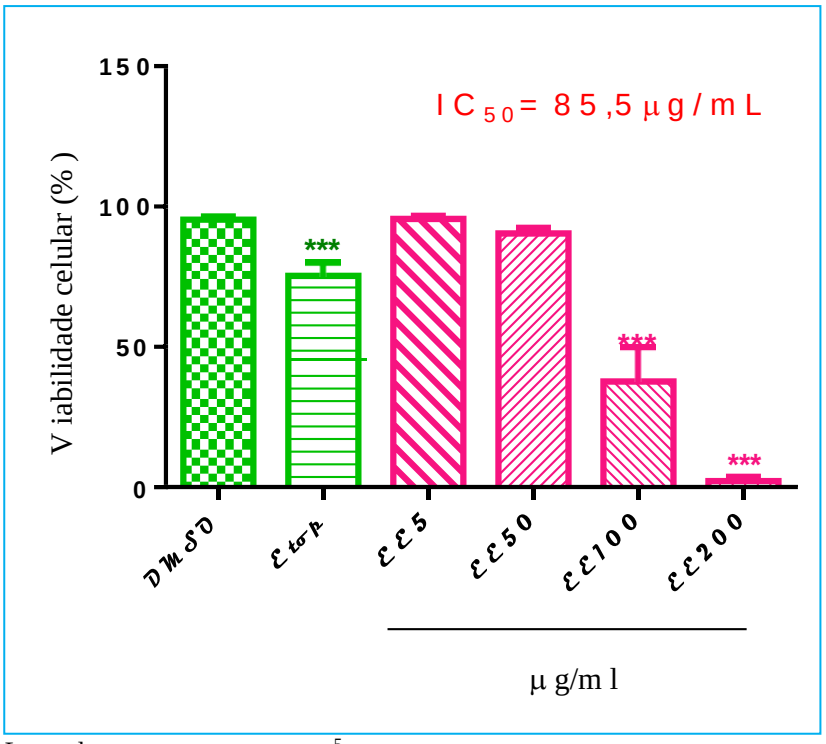
Em relação à citotoxicidade ocasionada pelo EE, observa-se nas Figuras 7 e 8 que os resultados mostram significativa inibição do percentual de viabilidade celular em todas as concentrações testadas, exceto para a linhagem A549. Contudo nota-se que a Jurkat. tem maior sensibilidade ao EE bruto que as demais linhagens. Esta atividade pode estar relacionada à presença de compostos do metabolismo secundário desta planta, como alcaloides, fenóis/taninos, flavonoides, saponinas, conforme observado na Tabela 2 (FIUZA *et al.*, 2008; BRANDÃO *et al.*, 2010; SANTOS; RODRIGUES, 2017).

Os resultados obtidos no rastreamento antineoplásico compartilham com os relatados por Kim e colaboradores (2003), que mostraram inibição gênica de *Eugenia caryophyllata* (Myrtaceae), sobre COX-2, implicada em processos de inflamação e câncer; e de Kviecinski (2013) que demonstrou o efeito da *Bidens pilosa* (Asteraceae) sobre linhagem de mama MCF7.

4.3.2 Citotoxicidade por exclusão de azul de tripam

Foram realizados três ensaios independentes em triplicata. A proliferação e a viabilidade celular das células tratadas ou não com a *M. glomerata* foram expressas em porcentagem considerando a quantidade total de células (viáveis e não viáveis) como 100%. A taxa de mortalidade foi obtida pela porcentagem de células não viáveis (coradas de azul) em relação ao número total de células. A viabilidade celular está apresentada na Figura 18.

Figura 18 – IC_{50} do EE de *M.* glomerata sobre a viabilidade de células Jurkat avaliada por exclusão de azul de tripam no tempo de 72 h



Legenda: As células ($1x10^5$/ml) foram incubadas na ausência (controle) ou presença dos produtos naturais 72 h, e o IC_{50} foi determinado por ensaio de azul de trypan.. O gráfico representa a média ± DP de três experimentos independentes. * p<0,05; *** p<0,001; em comparação com o controle de DMSO (*One way* ANOVA seguido de teste *Tukey)*.

Nota: O IC_{50} foi calculado foié de 85,5 µg/ml.

Fonte: A autora, 2019.

O potencial antineoplásico do EE de *M. glomerata* foi investigado pelos métodos de exclusão do azul de tripamo e redução do MTT (Figuras 17 e 18). O método de exclusão do azul de tripam foi usado para verificar o efeito do EE, em diferentes concentrações (5, 50, 100 e 200 mg/ml), sobre a integridade da membrana celular da célula Jurkat em cultura por 72 h. Neste ensaio, os resultados demonstraram efeito citotóxico concentração dose dependente. Os valores da concentração inibitória 50% (IC_{50}), obtido nas curvas de concentração-resposta, ficaram por volta de 85,5 mg/ml. O ensaio de redução do MTT foi semelhante aos resultados encontrados no ensaio de exclusão por azul de tripam. A presença do EE, nas diferentes concentrações estudadas (5, 50, 100 e 200 mg/ml) reduziu a viabilidade

das células Jurkat quando comparado ao controle (Figura 16), de forma dose dependente. Os valores de IC_{50}, obtidos da curva de concentração-resposta, ficaram por volta 58,34 mg/ml. Uma vez que os métodos empregados para avaliação de citotoxicidade possuem objetivos distintos, diferenças na IC_{50} são esperadas (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007). O teste de redução do MTT avalia a capacidade da enzima succinato desidrogenase de reduzir o substrato MTT a cristais de formazana na mitocôndria da célula (MOSMANN, 1983; VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007). Por outro lado, o teste de exclusão do corante azul de tripam estuda a permeabilidade da membrana plasmática (BARILE, 1994; VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007). Portanto, mesmo que a membrana seja lisada por um agente citotóxico as organelas citoplasmáticas podem, ainda, manter sua atividade fisiológica (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007). Vale ressaltar que a atividade citotóxica demonstrada neste estudo não está descrita na literatura para linhagens neoplásicas.

4.3.3 Avaliação do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo

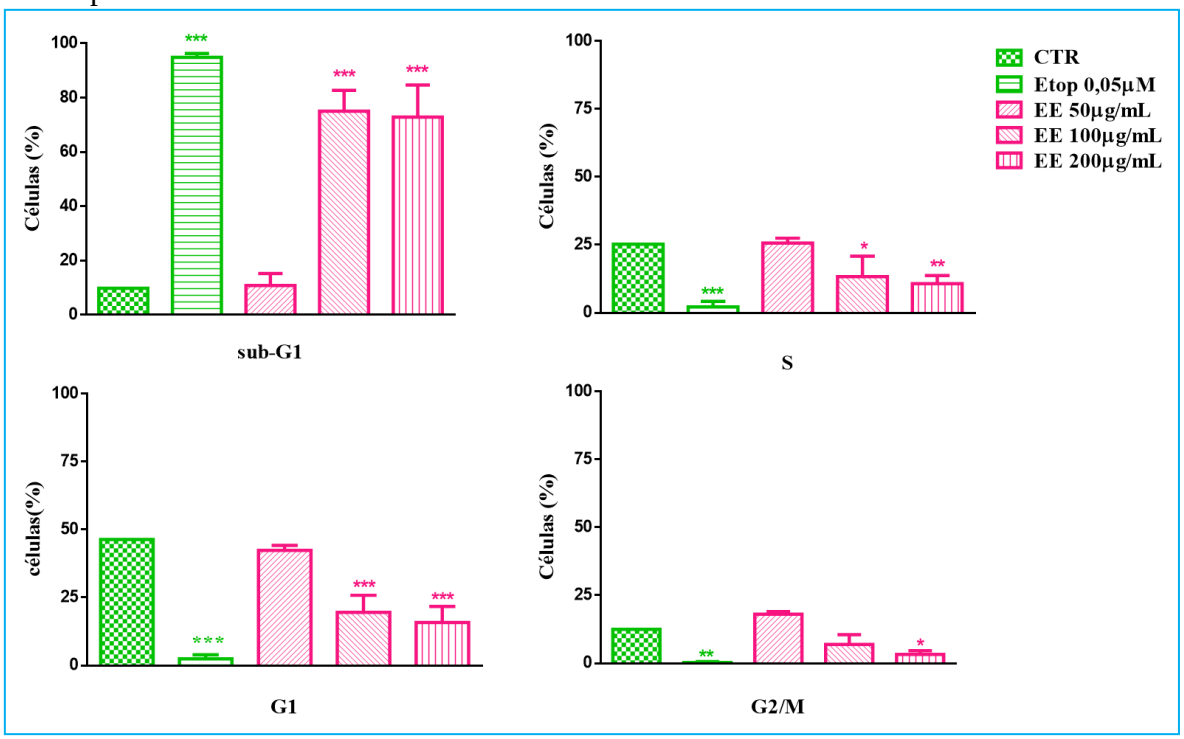
A avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo tem-se mostrado uma técnica seletiva para investigação do mecanismo de morte celular. Essa técnica permite quantificar o número de células presentes em cada uma das fases do ciclo celular (G1, S e G2) a partir do conteúdo do DNA (POMPILHO, BORGES e MIGUEL, 2013).

O período de crescimento celular inicia na fase G1 e se estende até a fase G2. Durante a fase S (síntese) ocorre a duplicação do DNA. Na fase G2 ocorre o término do crescimento celular. Na fase M ocorre o processo de mitose (ALMEIDA *et al.*, 2005). As fases G2 e M do ciclo celular aparecem na mesma região do histograma por possuírem conteúdo de DNA semelhante (POMPILHO, BORGES e MIGUEL, 2013). Células em estágio final de morte celular por apoptose e necrose apresentam fragmentação de DNA que pode ser observada na região sub G1na análise do ciclo celular (POMPILHO, BORGES e MIGUEL, 2013).

Neste sentido, o presente estudo mostra que o EE induziu morte celular nas concentrações 100 e 200 µg/ml, como pode ser visto pelo aumento do percentual de células em Sub.G1 na Figura 19. A concentração de 50 µg/ml apresentou resposta semelhante ao controle negativo. O efeito biológico nas concentrações 100 µg/ml e 200 µg/ml foi semelhante ao observado para o etoposídeo (controle positivo).

Em todas as demais fases do ciclo celular pode-se observar a diminuição de células nas concentrações de 100 e 200 µg/ml, compatível com o aumento de morte celular como é possível notar na Figura 20.

Figura 19– Efeito biológico do EE de *M.glomerata* sobre o ciclo celular da linhagem Jurkat no tempo de 72 h



Legenda: Ensaio realizado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo para verificação dos efeitos citotóxicos de EE de *M. glomerata* (50 a 100 µg/ml) por meio de aumento da fração sub-G1 após o tratamento por 72 h. Os dados foram obtidos no programa FlowJo v.10 Análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 6. Os resultados representam a média ± DP de três experimentos independentes. * p<0,05; *** p<0,001; em comparação com o controle de DMSO (*One way* ANOVA seguido de teste *Tukey)*.

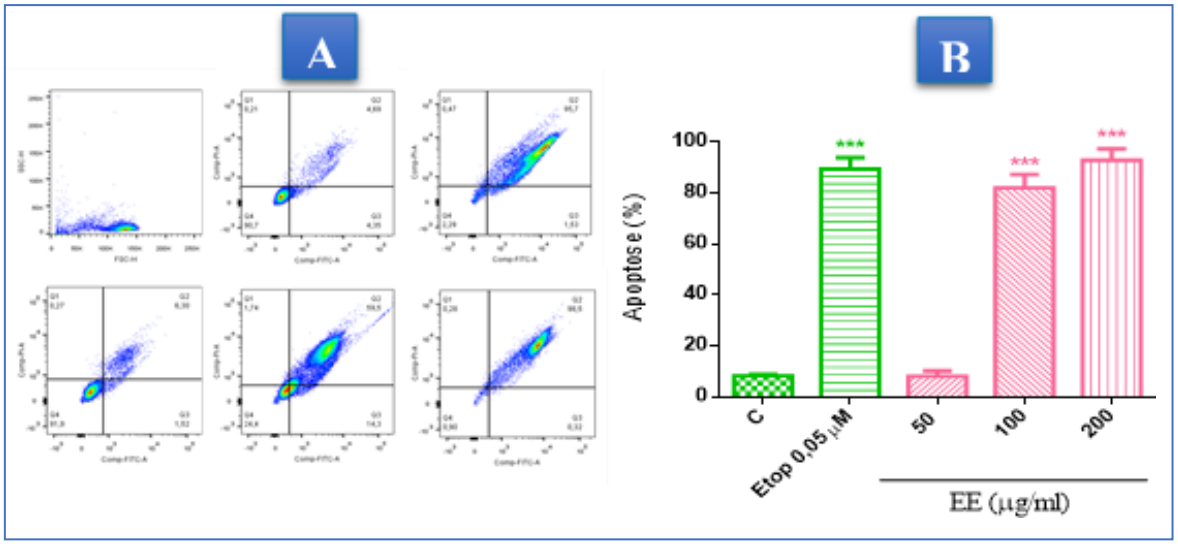
Nota: Pela propriedade de ser impermeável à membrana plasmática íntegra, o PI é utilizado em protocolos citofluorimétricos como corante vital de forma que as células negativas para a marcação com PI estão viáveis. Nas células mortas o PI se intercala ao DNA celular em função da perda da integridade da membrana plasmática destas células.

Fonte: A autora, 2019.

A proteína anexina V-FITC combinada com o fluorocromo PI tem utilizada na citometria de fluxo para diferenciar as células necróticas (positivas somente para a marcação com PI), as células em apoptose inicial (ainda com a membrana íntegra o suficiente para não possibilitar a entrada do PI; positivas somente para AnexinaV), e as células em apoptose tardia (dupla marcação) (HU, PARK, LIU *et al*., 2018) observado no *Dotplot* mostrado na Figura 20 A. Não foi observado células em necrose para as concentrações testadas.

Figura 20 – Efeito biológico do EE de *M.glomerata* sobre a apoptose na linhagem celular Jurkat no tempo de 72 h

.



Legenda: Ensaio realizado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo para verificação dos efeitos citotóxicos de EE de *M. glomerata* (50, 100 e 200 µg/mL) após o tratamento por 72 h .Em **A** *Dotplot* mostrando os efeitos das concentrações do EE sobre a linhagem Jurkat. Após incubação, as células foram marcadas com Anexina V- FITC e PI e sua expressão foi analisada por citometria de fluxo. Cada painel, representativo de um experimento de três realizados independentemente. Q1 mostra células em processo de apoptose estabelecido. Q3 indica células viáveis; Cada ponto representa uma célula detectada no sistema. Em **B** os valores referem-se à porcentagem de células detectada em cada quadrante. Note o aumento da apoptose para as concentrações de 100 e 200 µg/ml. Os dados foram obtidos no programa FlowJo v.10 Análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 6. Os resultados representam a média ± DP de três experimentos independentes. * $p<0,05$; *** $p<0,001$; em comparação com o controle de DMSO (*One way* ANOVA seguido de teste *Tukey)*.

Nota: Q1(quadrante superior direito) dupla marcação indica apoptose estabelecida; Q2 (quadrante inferior direito) marcação po PI indica células em processo de necrose; Q3 (quadrante inferior esquerdo) sem marcação indica células viáveis; Q4 (quadrante superior esquero) marcação por anexina indica células em apoptose inicial.

Fonte: A autora, 2019.

Segundo Brandão e colaboradores (2010) anticancerígenos podem atuar diretamente no DNA das células, ou indiretamente por inibição de funções metabólicas do DNA. Dentre os mecanismos de ação conhecidos pode-se citar a ação sobre a enzima DNA topoisomerase I, também conhecida como TOP1, que promove a quebra de uma das fitas de DNA e permite a rotação da fita quebrada sobre a fita integra, de modo a reduzir a tensão torcional da molécula. Algumas substâncias, derivadas do alcaloide camptotecina, inibem a religação do DNA depois da quebra mediada pela TOP1 (POMMIER, 2006; BRANDÃO *et al.*, 2010). Os resultados revelados neste estudo sugerem um comportamento do EE emelhante ao etoposídeo conforme é possível observar nas Figuras 19 e 20.

O etoposídeo e o teniposídeo têm tido uma participação muito importante no tratamento quimioterápico do câncer. Entretanto o etoposídeo causa diversas reações adversas (ALMEIDA, 2005; POMMIER, 2006; BRANDÃO *et al.*, 2010). As comumente relatadas são: supressão de medula óssea, náusea, vômitos e alopecia e em doses elevadas hepatotoxicidade, febre e ardor, entre outros. O efeito adverso de maior gravidade induzido pelo etoposídeo é o possível desenvolvimento de leucemia mieloide aguda, com diferenças de incidência de acordo com a indicação do tratamento.

Diante do exposto, os mecanismos de ação dos antineoplásicos derivados de plantas, visam à interrupção do ciclo celular das células cancerosas, tendo como característica essencial a seletividade de ação sobre as células neoplásicas. Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade demonstram que OE e o EE não apresentam citotoxicidade em células de macrófagos RAW264.7.

Na literatura, até o momento, não foi encontrado um único trabalho referindo a espécie *M. glomerata* com atividade antineoplásica, tornando este trabalho inédito. Leipelt (2016) demonstrou a potencialidade do EE para o gênero *Myriciaria* ao estudar a espécie *Myrciaria plinioides*. Em seu estudo observou que o EE de *M. plinioides* atua em vias de sinalização relacionadas com proliferação e morte celular nas células de carcinoma hepatocelular (HepG2) e próstata (LNCaP), através da análise de expressão dos marcadores p38-α, pp38-α, NF-κB e caspase-3, envolvidos na carcinogênese, e o efeito sobre a viabilidade celular através do método de MTT. Leipelt (2016) observou que viabilidade das células neoplásicas foi alterada significativamente, em ambas as linhagens celulares quando tratadas com o EE, o que foi corroborado neste estudo para as linhagens testadas. Estudos futuros são imprescindíveis para averiguar os mecanismos de ação celular e indução de morte de *M glomerata* em células neoplásicas, bem como elucidar os princípios ativos presentes nesta planta, o que pode contribuir para a geração de novas biomoléculas derivadas de *M glomerata* com potencial antineoplásico.

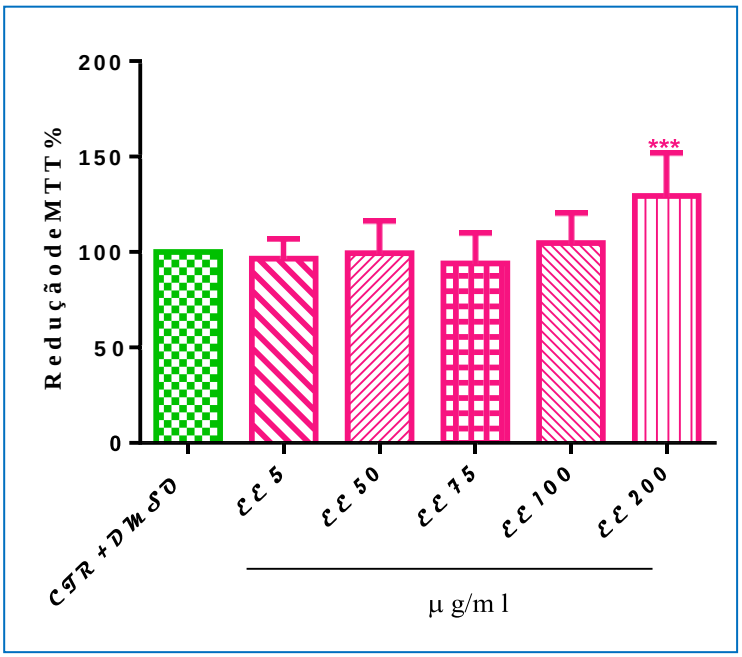
4.4 Avaliação da citotoxicidade na linhagem normal VERO

A linhagem de células Vero, originária de rim de macaco *Cercopithecus aethiops* (African green monkey), é usada em caráter de rotina por laboratórios de controle de qualidade que monitoram a potência de vacinas contra o sarampo (RHIM *et al.*, 1969;

TAKATA *et al.*,1994) e que investigam a toxicidade como controle de toxicidade em relação as células normal (VIJAYARATHNA; SASIDHARAN, 2012).

A avaliaçao do efeito citotóxico frente às células VERO do EE *M. glomerata* revelou ausência de citotoxicidade para as cinco concentrações testadas, 5, 50, 75, 100 e 200 µg/ml, conforme apresentado na Figura 21.

Figura 21– Citotoxicidade do EE de *M. glomerata* sobre a linhagem celular VERO no tempo de 72 h



Legenda: As células Vero ($1x10^5$/ml) foram incubadas na ausência (controle) EE por 72 h.. O gráfico representa a média ± DP de três experimentos independentes. * p<0,05; *** p<0,001; em comparação com o controle de DMSO (*One way* ANOVA seguido de teste *Tukey).*

Nota: Note que o EE de *M. glomerata* não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas. A concentração de 200 µg/ml parece induzir a viabilidade.

Fonte: A autora, 2019.

Atualmente há muitas drogas quimioterápicas que embora sejam tóxicas contra células cancerosas, apresentam baixa especificidade e elevada toxicidade, sendo tóxicas para células saudáveis (VIEIRA; GAMARRA, 2016). Neste sentido, o EE de *M. glomerata* apresentou resultados promissores, pois há indícios de seletividade, pois apresentou toxicidade para as linhagens neoplásicas e, na maior concentração testada, parece estimular a viabilidade em células normais.

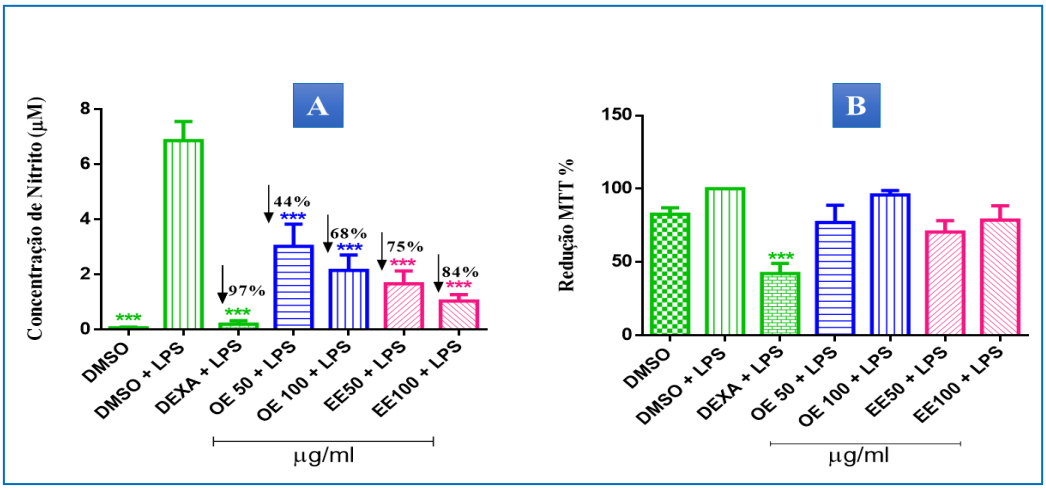
4.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória.

Para avaliar a atividade inflamatória do OE e do EE foram realizados três ensaios distintos em triplicata: ensaio de NO e a citotoxicidade (MTT), *Wound Healing* e *Boyden.*

4.5.1 Ensaio de NO e Citotoxicidade em RAW264.7

A Figura 22 mostra a inibição do NO sobre a linhagem celular de macrófagos RAW 264-7, ativados por LPS. O tratamento feito com OE e EE, nas concentrações de 50 e 100 µg/ml, foram capazes de inibir a produção de NO nas células RAW 264.7, induzida por LPS (1 µg/ml), com viabilidade superior a da dexametasona (DEXA) (1 µg/ml). Os resultados obtidos neste estudo mostram a redução do NO no sobrenadante de cultivo em 24 h na presença de OE e EE, sem afetar significativamente a viabilidade celular avaliada pelo método do MTT.

Figura 22 – Efeito do OE e do EE na expressão de NO em linhagem RAW 264.7 ativada por LPS



Legenda: Em **A** As células RAW 264.7 ($1x10^5$/ml) foram ativadas com LPS e tratadas, ou não (controle), com os produtos naturais ou DEXA por 24 h. A expressão de NO foi determinada por reação de Griess. Em **B** o ensaio de MTT foi realizado nas mesmas condições para confirmar o efeito imunorregulador. Os gráficos representam a média ± DP de três experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em comparação com o controle de DMSO (*One way* ANOVA seguido de teste *Tukey*).

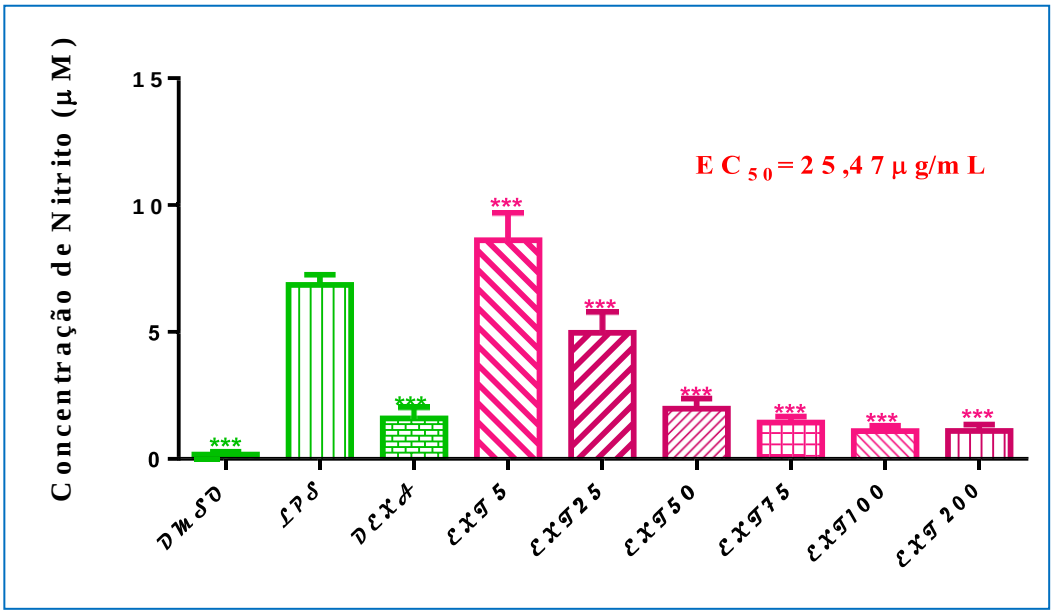
Nota: Observe que o OE e o EE *M. glomerata* em ambas as concentrações testadas foi capaz de inibir a produção de NO e manteve a viabilidade celular superior a DEXA.

Fonte: A autora, 2019.

Os resultados dos testes efetuados na linhagem RAW 264.7 estimuladas com LPS com o OE e o EE de *M. glomerata* evidenciaram a diminuição de nitritos nas concentrações testadas de 50 e 100 µg/ml (Figura 20). Vale mencionar que o ensaio de MTT foi realizado na mesma população celular na qual o NO foi quantificado. As concentrações testadas não apresentam citotoxicidade, o que demonstra uma boa atividade anti-inflamatória.

O EC_{50} calculado, valor que corresponde a uma diminuição de 50% do da concentração de nitrito inicial, foi 25,47 µg/ml. Para obtenção do EC_{50}, foram avaliadas seis concentrações 5, 25, 50, 75, 100 e 200 µg/ml do EE de *M. glomerata* em função da diminuição da concentração de nitrito no tempo de tratamento de 24 h para a RAW 264.7 como mostra a Figura 23. O EC_{50} foi calculado de acordo com a regressão linear dos valores obtidos.

Figura 23 – EC_{50} EE de *M. glomerata* na expressão de NO em linhagem RAW 264.7 ativada por LPS



Legenda: O EC_{50} calculado foi 25,47 µg/ml As células RAW 264.7 ($1x10^5$/ml) foram ativadas com LPS e tratadas, ou não (controle), com os produtos naturais ou DEXA por 24 h. A expressão de NO foi determinada por reação de Griess. O gráfico representa a média ± DP de três experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em comparação com o controle de DMSO (*One way* ANOVA seguido de teste *Tukey*).

Nota: Observe que o EE *M. glomerata* foi capaz capaz de inibir a produção de NO nas concentrações de 25 a 200 µg/.

Fonte: A autora, 2019.

Os macrófagos desempenham papéis importantes na inflamação através da produção de várias moléculas pró-inflamatórias, incluindo o NO. O NO é o principal mediador citotóxico de células imune efetoras ativadas, e constitui uma das mais importantes moléculas reguladoras do sistema imune. Atua como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. Contudo, o NO é potencialmente tóxico, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003)

O aumento exacerbado na produção de NO tem sido associado a uma série de doenças inflamatórias, incluindo arteriosclerose e artrite (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003; JOO, *et al.*, 2014). O uso de inibidores de NO tem mostrado um efeito benéfico em várias patologias. Na artrite induzida experimentalmente em animais, ocorre uma atenuação dos sinais clínicos e histológicos da doença. Na glomerulonefrite, há uma diminuição da deposição de complexos imunes nos rins, levando a uma considerável melhora clínica. No diabetes dependente de insulina (tipo I), induzido imunologicamente, estudos demonstraram

que a destruição de células pancreáticas beta é mediada pelo NO e as primeiras tentativas de inibir a i-NOS foram animadoras. No transplante renal, foi obtida uma melhora substancial dos sinais clínicos de rejeição após a inibição seletiva da i-NOS. No choque séptico, a inibição seletiva da i-NOS foi benéfica (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003; JOO, *et al.*, 2014).

Os resultados aqui encontrados podem estar relacionados às moléculas presentes em *M. glomerata.* A literatura menciona as plantas como fontes de moléculas antioxidantes naturais, especialmente terpenoides, compostos fenólicos, taninos, cumarinas e flavonoides para os quais os testes fitoquímicos de *M. glomerata* foram positivos. Portanto, a busca por antioxidantes naturais para inibir a produção de NO tem estado em evidência (JOO, *et al.*,2014). Os resultados aqui encontrados corroboram com os descritos na literatura.

Para Dusse, Vieira e Carvalho (2003) o campo está aberto para investigação do papel do NO em circunstâncias diversas, e o número de publicações relacionadas a esta molécula tem aumentado exponencialmente. A determinação de ativadores e inibidores específicos da síntese de NO constitui o novo desafio para o entendimento e o tratamento de várias doenças, e tem sido um dos principais alvos da indústria farmacêutica, tornando a *M. glomerata* uma forte candidata ao tratamento de doenças inflamatórias em geral.

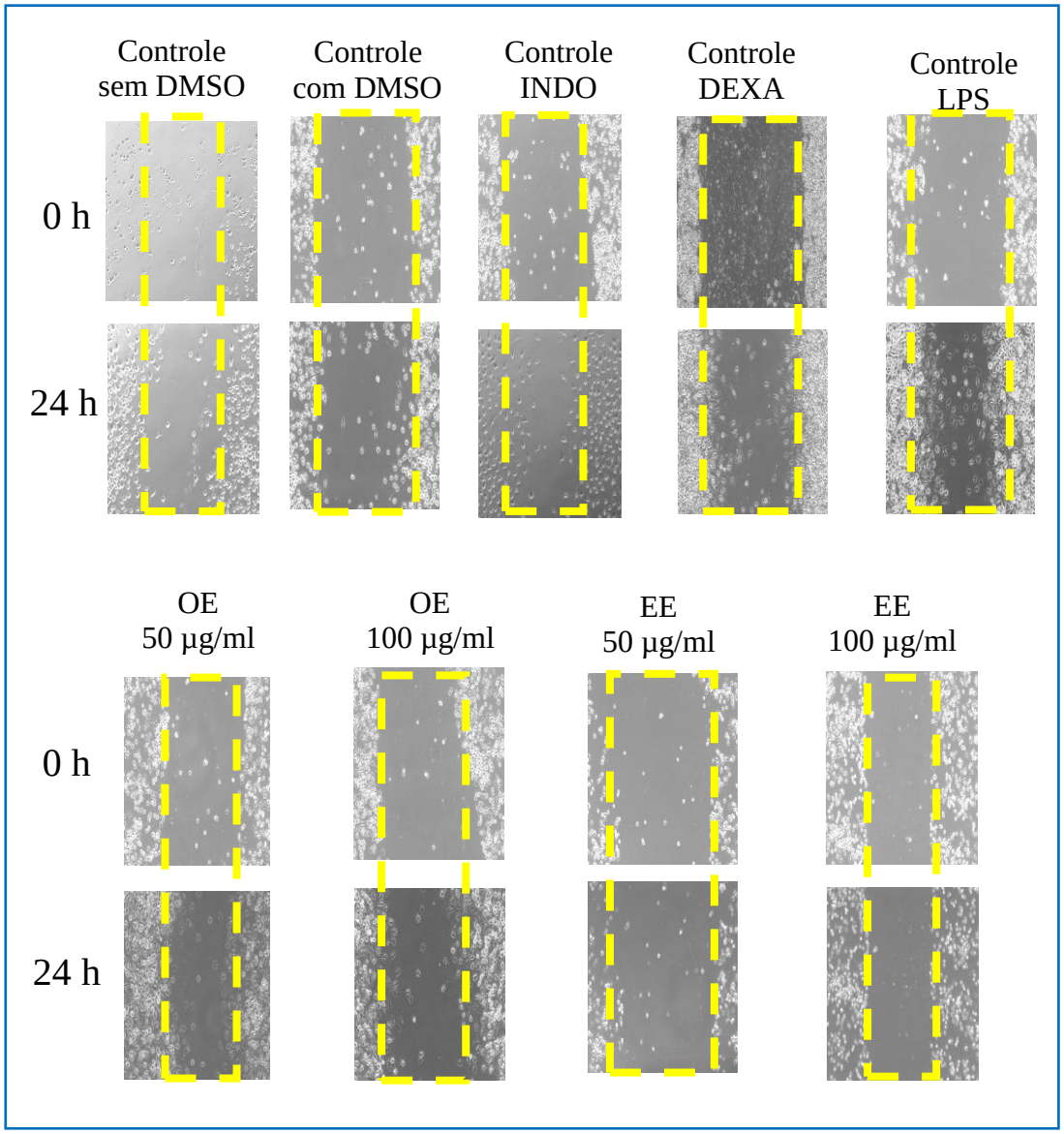
4.5.2 Ensaio *Wound Healing*

O ensaio de *wound healing* tem sido amplamente utilizado para estudar a migração celular (HULKOWER; HERBER, 2011). A migração celular é definida como o movimento de células de um local para outro e tem sido considerada uma etapa crucial em diversos processos patológicos e fisiológicos dentre os quais pode-se citar: a cicatrização de feridas, câncer e inflamação (HULKOWER; HERBER, 2011). Uma das vantagens deste ensaio é o fato das células se moverem sempre em direção ao fechamento da ferida favorecendo o estudo de substâncias com potencial terapêutico (HULKOWER; HERBER, 2011). As imagens do movimento celular foram capturadas no tempo 0 h e no tempo de 24 h.

A Figura 24 mostra os efeitos do OE e do EE sobre a migração celular na linhagem celular RAW264-7, estimulada por LPS (1 µg/ml). Os tratamentos feitos com OE e EE nas concentrações de 50 e 100 µg/ml foram capazes de inibir a migração das células em grau superior ao dos controles com DEXA (1 µg/ml) e de indometacina (INDO) (5 µg/ml),

utilizados nos experimentos. Essa redução pode ser percebida ao comparar as áreas livres de células estimuladas com LPS e as tratadas com os produtos vegetais.

Figura 24 – Ensaio de *Wound Healing*



Legenda: O tempo 0 h indica a criação da ferida e o tempo 24 h mostra se houve ou não migração da celular após estímulo com LPS. Note que no tempo de 24 h o OE e o EE inibiram a migração celular em ambas as concentrações testadas , quando comparado ao LPS.

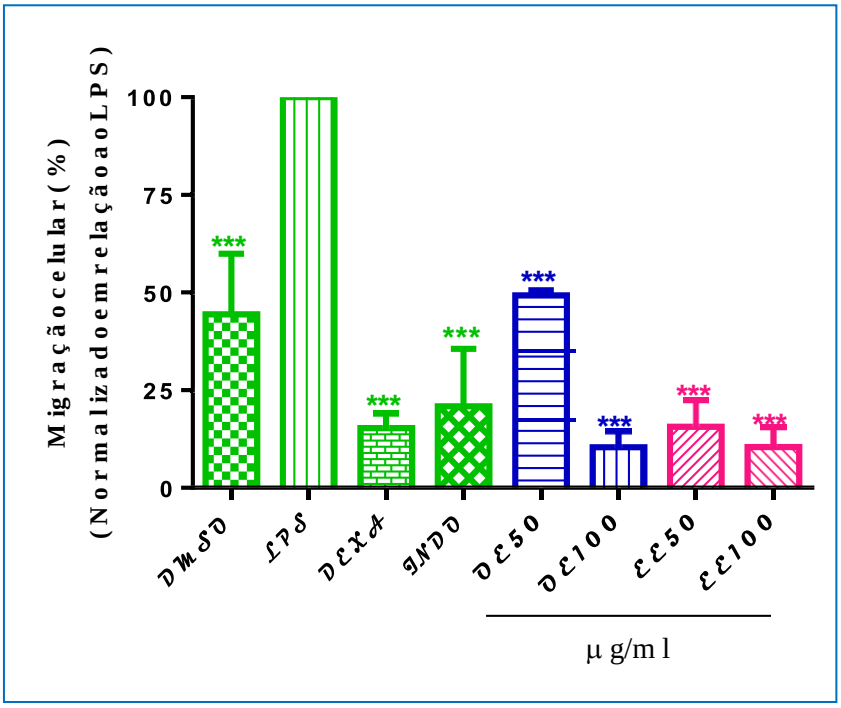
Nota: As imagens são representativas das triplicatas. Observe que o efeito do EE foi superior ao OE em ambas as concentrações.

Fonte: A autora, 2019.

4.5.3 Ensaio de *Boyden*

O ensaio de migração de *Boyden*, também conhecido como *transwell*, é uma importante ferramenta para avaliação do comportamento quimiotáxio de culturas celulares *in vitro* (SANTOS, 2013). Este ensaio avalia a migração celular e pode ser quantitativo. Os resultados mostraram que ocorreu diminuição significativa da migração celular para ambas as concentrações testadas, tanto do OE, quanto do EE de *M. glomerata* como é observado na Figura 25, da mesma forma observada para a migração por *Wound Healing.*

Figura 25 – Ensaio de *Boyden*



Legenda: Efeitos inibitórios do OE e do EE de *M. glomerata* sob as células RAW264.7 estimuladas com 1µg/mL de LPS. Os gráficos representam a média ± DP de três experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; em comparação com o controle LPS.

Nota: Observe que o efeito do EE foi superior ao OE em ambas as concentrações testadas.

Fonte: A autora, 2019.

Os resultados anteriormente apresentados evidenciaram que o OE e o EE obtidos de *M. glomerata* exibem efeito anti-inflamatório *in vitro*. Houve diminuição significativa do mediador inflamatório óxido nítrico e da migração da linhagem macrofágica RAW264.7.

Vários autores relataram que os extratos de plantas são capazes de inibir a a produção de NO induzida por LPS (TAIRA; NANBU; UEDA, 2009)

Sendo assim, as propriedades anti-inflamatórias observadas neste estudo podem estar associada a presença de flavonoides os quais estão sendo associados a uma ampla variedade de atividades biológicas, como a ação anti-inflamatória e antioxidante (SAVI *et al.*, 2017; SANTOS; RODRIGUES, 2017).

Logo, os resultados observados neste estudo condizem com os descritos na literatura tanto para a espécie quanto para a família Myrtaceae. Fisher (2007) realizou estudos *in vivo*, com os extratos metanólico e acetônico bruto obtidos dessa espécie, e observou que ambos os extratos demonstraram efeito superior ao da INDO na redução no teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton. Fisher (2007) atribuiu aos extratos propriedades antiedematogênica e antinociceptiva. O extrato de folha de *Eugenia uniflora* é recomendado popularmente contra a gota (SCHMEDA-HIRCHMANN *et al.*, 1987) por seus efeitos antioxidantes (THEODOLUZ *et al*., 1988). As folhas de *Eugenia brasiliensis* (grumixama) são reportadas como antirreumáticas (CORRÊA, 1984). As folhas e a casca dos frutos de *M. cauliflora* tem sido usadas para tratar inflamação (BORGES; CONCEIÇÃO; SILVEIRA, 2014). Ramos e colaboradores (2006) também estudaram a composição química e a atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais extraídos de folhas de cinco espécies de Myrtaceaes dos gêneros *Eugenia* e *Psidium* evidenciando propriedades anti-inflamatórias para ambos os gêneros.

Apesar das evidências sobre o potencial terapêutico das espécies de *Myrciaria* como fonte de obtenção de compostos úteis, poucos estudos sobre a composição química e a atividade biológica das espécies pertencentes a esse gênero foram relatados, tornando os resultados aqui obtidos bastante promissores.

CONSIDERÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

a) *M. glomerata* possui propriedades terapêuticas devido conter substâncias de natureza fenólica em particular flavonoides.
b) foi possível elucidar a composição do OE de *M. glomerata* cujos componentes majoritários parecem contribuir com a atividade antineoplásica e anti-inflamatória observada.
c) as classes de metabólitos secundários presentes no EE de *M. glomerata* podem ser responsáveis pela atividade atividade antineoplásica e anti-inflamatória observada.
d) *M. glomerata* parece não possuir citotoxicidade para a linhagem celular normal.

Sendo assim, todos os objetivos propostos foram alcançados, surgiram evidências de que os estudos com a *M. glomerata* devem continuar, já que os resultados de avaliação da potencialidade antineoplásica foram bem sucedidos. As concetrações testadas neste estudo foram citotóxica para as linhagens neoplásicas mas não apresentaram citotoxicidade para a linhagem normal.Para finalizar, cabe ressaltar que os estudos antineoplásicos são inéditos para esta espécie tornando os resultados muito promissores, tanto do ponto de vista biológico quanto químico, haja vista que são raros os estudos científicos para esta espécie e para este gênero, sugerindo, portanto, a continuidade de estudos fitoquímicos para elucidar os princípios ativos visando verificar as possiblidades de abordagens terapêuticas, com vistas, futuramente, ao tratamento de inflamação e/ou neoplasias, em uma abordagem interdisciplinar.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil componentes by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, p.456, 2001.

ALCÂNTARA, J. M. et al. Composição química de óleos essenciais de espécies Aniba e Licaria e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. *Quím. Nova.* v.33, n.1, São Paulo, 2010.

ALMEIDA, V. L. et al. 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, jan./feb. 2005.

ANAND, K. K. et al. Antiinflamatory, antipyretic and analgesic properties of bavachinin-a flavanone isolated from seeds of Psoralea corylifolia Linn. (Babchi). *Indian J Exp Biol*.; v.16, n.11, p.1216-7, Nov. 1978.

ANVISA. FORMULÁRIO DE FITOTERÁPICOS DA FARMACOPEIA BRASILEIRA / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259456/Suplemento+FFFB.pdf/478d1f83-7a0d-48aa-9815-37dbc6b29f9a>. Acesso em:16 dez. 2019.

APEL, M. A. et al. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of Myrciaria tenella and Calycorectes sellowianus. *Journal Pharmaceutical Biology*. v. 48, Issue 4, 2010.

ATCC, A. T. C. C.-. (2012) Catalog Search: A549.

AVELAR-FREITAS, B.A**.** et al., Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res.* v.47, n.4 Ribeirão Preto, Apr. 2014, Epub, Mar. 2014.

BARBOSA, W. L. R Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. *Rev Científica da UFPA*. v. 4, p. 12-18, 2004.

BARILE, F. A. In vitro cytotoxicology: mechanisms and methods, 1st ed. Florida: *CRC Press*, p. 222, 1994.

BARREIRO, E. J. et al. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e antitrombóticos. *Química Nova.* v. 25, n. 1, 129-148, 2002.

BEGALLI, B. M. *Estudo da ação citotóxica dos adenovírus Adp53 e AdCDKN2A em associação com cisplatina sobre linhagens de carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC)*. 2013. 57f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal – Universidade de Lisboa, 2013.

BORGES, L. L., CONCEIÇÃO, E. C., SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of Myrciaria genus. *Food Chemistry*. v. 153, 15. p. 224-233, June 2014.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quím. Nova*. v. 33, n. 6, São Paulo, 2010.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro; 2018. [citado 2017 Jan 5]. Disponível em:<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao. asp>. Acesso em : 18 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (MARA) – Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor. KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. EMBRAPA – CTA Doc.8, Rio de Janeiro, EMBRAPA – CTA 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60f. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agentes). *Brazilian Journal and Biological Research.* v. 33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, A. C. B. *Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de dissertação para espécies vegetais oficializadas no Brasil.* 2011. 318f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CAVALARO, V. e OLIVEIRA, C. R. Fitoquímica: triagem em extratos de plantas com abordagens cromatográficas “estado da arte” *Brazilian Journal of Natural Sciences* | Versão On-line ISSN 2595 - 0584, n. 1, v. 3, out. 2018

CERQUEIRA, M. D *et al.* Variação sazonal e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Myrcia myrtifolia. J. Braz. Chem. Soc*., v. 18, n. 5, São Paulo, 2007.

CHABNER, B. A. et.al. Antineoplásicos, in: HARDMAN, Joel G; LIMBIRD, Lee E. GOODMAN; GILMAN: as bases farmacológicas a terapêutica. 10. ed., cap.52, p.1042 - 1093, *Mc Graw Hill*, Rio de Janeiro, 2005.

CHOMA, I. M. e JESIONEK, W. TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants Chromatography. 2. ed., p. 225-238, 2015.

CONDEELIS, J. e POLLARD, J.W. *Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis.* v. 124, Cap.2, p. 263-266, jan 2006.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Pathologic Basis of disease***.** W.B. Saundens Co. Philadelfia, USA, 2001.

CORRÊA. Manual pio, Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. v. 4, Rio de Janeiro, p. 375 e v. 3, p. 499-501, 1984.

CRAGG, G.M; HAUS, P.G; NEWMAN, D.J. Impact of natural products on developing new anticancer agents. *Chem Rev.* n.7, p. 3012-43, 2009.

CRAVEIRO, A. A. et al. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. *Universidade Federal do Ceará Fortaleza:* Edições UFC, p.209, 1981.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumatol*. v. 50, n. 4, São Paulo, July/Aug. 2010.

CRUZ, A. V. M. e KAPLAN, M. A. C. Estudo comparativo do perfil químico e do uso popular de espécies das famílias Myrtaceae e 19 Melastomataceae. XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Macromoleculares. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense. 2004.

CRUZ, L.O. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade do extrato metanólico de folhas de Chrysobalanus iacoL. Sobre linhagens de pulmão human. 2018. 27 f. Projeto de dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade do estado do rio de Janeiro, Rio de janeiro, 2018.

DE VITA, V.T. et al. Cancer: Principles and Practice of Oncology., Philadelphia: Lippincott, Williams e Wilkens, v. 1, 8. ed., p. 147-157, 2008.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M. Estudo Anatômico e Prospecção Fitoquímica de Folhas de Eucalyptus benthamii Maiden et Cambage. *Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)* Lat. Am. J. Pharm. 29 (1): 94-101, 2010.

DONATO, A. M. *Myrtaceae: Anatomia foliar de cinco espécies nativas com potencial medicinal e/ou econômico*. 2003, 199 f. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

DONATO, A. M.; MORRETES, B.L. Estudo anatômico das folhas de Psidium widgrenianum Berg. (Myrtaceae), uma potencial espécie medicinal. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 86 (2): 65-70, 2005. _ Anatomia foliar de Eugenia brasiliensis Lam. (Myrtaceae)proveniente de áreas de restinga e de floresta. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 (3): 426-443, Jul./Set. 2007._ Anatomia foliar de Eugenia florida DC. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19 (3): 759-770, Jul./Set. 2009.

DUARTE, A. R. *Chemical variability of essential oils and phenol content in leaves and fruits of jabuticabeira (Myrciaria cauliflora)*. 2012. 83 f. Tese (Doutorado em Ciencias Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

DUSSE, L. M. S., VIEIRA, L. M., e CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 4, p. 343-35, 2003.

DUTRA et al., Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug Discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological research*, v. 112, p. 4 -29, 2016.

FERNANDES, M.R.V. *Padronização e avaliação biológica de extraos secos de Psidium guajava L. obtidos por spray dryng.* 2013. 237 f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Ribeirão Preto /USP, São Paulo, 2013.

FISCHER, L.G. O. *Avaliação farmacológica de extratos e substâncias obtidas de Plinia glomerata.* 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

FIUZA, S. T. *et al.* Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora L. (Myrtaceae). Revista eletrônica de farmácia*, v. 2, nov. 2008.

FOOD INGREDIENTS BRASIL, n. 11, 2010.

FRANCO et al. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de Eucaliptus cinerea. F. Mull. Ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 15, n. 3, p. 191-194, Jul./Set. 2005.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. cap. 2. Princípios da citometria de fluxo, 2018. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/picf/PROD_LITERAT/Apostilas/ApostilaCMFCurso_Ferias2018.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2019

FUKUMASU, H., *et al.* Protective effects of guarana (Paullinia cupana Mart. var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. *Food and Chemical Toxicology,* v. 44, Issue 6, Pages 862-867, June 2006.

FUKUMASU, H. *et al.* Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. *Revista Brasileira de Toxicologia* .V. 21, n. 2, p. 49-59, 2008.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista. *Cad. Saúde Pública*, v. 13, suppl. 1, Rio de Janeiro, 1997.

GOSWAMI, K. K. et al. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cellular Immunology*, v.316, p.1-10, Jun. 2017.

GRIESS, P. *Ber. Dtsch. Chem*., Ges.,v. 12 , p. 426, 1879.

GRIVENNIKOV, S. I. et al. Immunit,Inflammation, and cancer. *Cell press*, v. 140, 6. ed. p.883-899, Mar. 2010.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflamtion and oncogenesis: a vicious connection. *Current opinion in genetic e development*. v 20, cap. 1, p.65-71, Fev. 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*., v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L.M. *Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment*. Cancer cell., v. 21, cap.3, p. 309-322, Mar. 2012.

HOLLER, F. J., SKOOG, D. A. e CROUCH, S. R. Princípios de análise instrumental. Editora Artmed. Porto Alegre, p. 1053, 2009

HU, PARK, LIU *et al.* MesenchymalStemCellMicrovesiclesRestoreProteinPermeability Across Primary Cultures of InjuredHuman Lung Microvascular Endothelial Cells. *Stem cells translational medicine. Cell based drug development,screening,and toxicology.* April 3, 2018.

HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics*,v. 3, n. 1, p. 107-124, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER.

_____*Atlas de mortalidade por câncer no Brasil.* 1979-1999. Ministério da saúde, 395f. 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer*. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2019

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER.

_____*Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil* / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. ISBN 978-85-7318-361-0 (versão eletrônica)

KATO, E. T. M.; BACCHI, E. M.; HERNANDES, L. S. *Farmacobotânica e atividade antiúlcera de plantas medicinais brasileiras* p. 177-196. Farmacognosia coletânea científica- Souza, G. H. B.; Mello, J. C. P.; Lopes, N. P.; Ed. UFOP, Ouro Preto, 2012.

KESKES, H.; et al. LC-MS-MS Ang GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian Juniperusphoenice leaves. *PharmaceuticalBiology*, Taylor & Francis: p. 88- 95, dez. 2017.

KIECHLE, F.L.; MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. *Am. J. Clin. Pathol*., v. 100, p. 567-75, 1993.

KLENICY, K. L et al. Atividades biológicas dos óleos essenciais de Endicheria citriodora, uma Lauraceae rica em geranato de metila. *Quim. Nova*, v. 36, n. 6. p. 826-830, 2013.

KOKOTKIEWICZ, A. et al. Densitometric TLC analysis for the controlo of tropane and steroidal alkaloids in Lyciumbarbarum. *Food Chemisrty*, Elsiever: v.221, p 535-540, Abr. 2017.

KORHONEN, R. et al. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. Current Drug Targets. *Inflammation & Allergy*, v. 4, n. 4, p. 471- 479, 2005.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflamation: gearing the journe to câncer. *Mutation Research*, v. 659, p. 15–30, jul./ago. 2008.

_____*Emerging avenues linking inflammation and cancer.* Free radical biology and medicine. v.52, cap.9, p. 2013-2037, May. 2012.

KVIECINSKI, M. R. *Atividade antitumoral de extratos de Bidens pilosa linné ricos em poliacetilenos e de juglona associada ao ascorbato.* 2013. 144 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

LAI, J. F.; FRANKE, A. A. Analysis of circulating lipid-phase micronutrients in humans by HPLC: Review and overview of new developments. *Journal of Chromatography* B, [S. l.], v. 931, p. 23-41, 2013.

LANÇAS, F. M. C*romatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*. Campinas, São Paulo. Ed. Átomo, 2009.

LAWRENCE, T; WILLOUGHBY, D, GILROY, DW. Anti-inflammatory lipid Mediators and insights into the Resolution of inflammation. *Nat. Rev. Iimmunol*,v. 2, p. 787-795, 2002.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. *Revista da SPDV.v.* 69, n. 3, 2011.

LEIPELT, J. *Avaliação in vitro do potencial biológico de myrciaria plinioides (d. Legrand) em células tumorais.* Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Centro Universitário Univates. Lajeado, abril 2016.

LENON, G.B. et al. Inibição da produção induzível de óxido nítrico e expressão da proteína iNOS na aorta de ratos estimulada por lipopolissacarídeos e macrófagos Raw 264.7 pelo extrato etanólico de uma fórmula fitoterápica chinesa (RCM-101) para alérgicos rinite. *Journal Ethnopharmacol*.,v. 116, p. 547-553, 2008.

LYSENKO, L. V. Anti-inflammatory effect of azulene of Eucalyptus oil. *Farmacol Toksikol*, v. 30, p. 341 – 343,1967.

LOPES, M. M**.** *Composição química, atividade antibacteriana e alelopática dos óleos essenciais de Eugenia uniflora L. e Myrciaria glazioviana (Kiaersk) G. M. Barroso* e *Sobral (Myrtaceae),* 2008. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciência – pós graduação em Agroquímica) – Universidade federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008. Disponível em: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/2757>. Acesso em: 27 jan. 2019.

MARQUES, J. P.; LOPES, G. C. *Alcaloides como agentes antitumorais: considerações químicas e biológicas. Revista UNINGÁ* Review. v. 24, n. 1, p. 56-61; out./dez. 2015. ISSN online 2178-2571

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*,v. 454, p. 428-435, jul. 2008.

MELO, J. G. et al., Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*., v. 2011, 14 p, 2011.

MESQUITA, M. L. *Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica.*2009. 223 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) Universidade de Brasília – DF, 2009.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Met*., v. 65, p. 55-63, 1983.

NEWMAN, D. J. e CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*., p. 311-335, 2012.

NIEHUES, J. et al. *Levantamento etnofarmacológico e identificação botânica de plantas medicinais em comunidades assistidas por um serviço de saúde.* Arquivos Catarinense de Medicina. v. 40, n. 1, 2011.

OLIVEIRA, C. B. *et al.* Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora I. (pitanga). Ciencia Odontologica Brasileira,* v. 12, n. 2, p. 29-34, abr./Jun. 2009.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med*, São Paulo, v. 89,n. 1,p. 21-31, jan./mar. 2010.

PACHECO-SILVA, N. V.; DONATO, A. Morpho-anatomy of the leaf of *Myrciaria glomerata.. Rev. bras. Farmacogn.*, v. 26, n. 3, Curitiba, May/June 2016.

PEREIRA, M. C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciênc. Agrotec*., Lavras, v. 30, n. 4, p.731-738, jul./ago. 2006.

PESIC, M.; GRETEN, F. R. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY*, v. 43, p. 55-61, Dez. 2016.

POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond**.** *Nat. Rev. Cancer*.,v. *6*, p. 789-802, October 2006.

POMPILHO, W. M.; BORGES F. V.; MIGUEL, E. C. Biotecnologia e biodiversidade: as florestas brasileiras como fonte de novos fármacos com propriedades antitumorais. *Acta Scientiae e Technicae,* v. 1, n. 1, Feb. 2013.

RAMOS, M. F. S. Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of Essential Essential Oils from Five Myrtaceae Species. *Revista Fitos,* v.2, n. 02, set. 2006.

REFLORA. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/BemVindoConsultaPublicaHVConsultar.do?modoConsulta=LISTAGEM&nomeCientifico=Myrtaceae+myrciaria+glomerata&quantidadeResultado=20&d-16544-t=testemunhos&d-16544-p=1>. Acesso em: 27 jan. 2019.

RIEGER, A. J., NELSON, K. L., KONOWALCHUK, J. D., BARREDA, D. R. Modifi ed Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*, v. 50, p. 1-4, 2011.

RENZI, D.; VALTOLINA M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA*, v. 21, p. 89 - 96, 1993.

REUTER, S. *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free radical biology and medicine*. v.49, cap.11, p. 1603-1616, dez, 2010.

RHIM, J.S.; SCHELL, K.; CREASY, B.; CASE, W. Biological characteristics and viral susceptibility of an African Green Monkey Kidney cell line (Vero). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.132, p. 670-8, 1969.

ROCHA E SILVA, M. O. *Brief history of inflammation.* Handbook of experimental pharmacology. Eds. Vane, Jr.; Ferreira S. H., p.6-25, New York: Springer Verlag, 1978.

RODRIGUES, J.P. *et a*l. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical Cord blood. *Cryobiology*, Estados Unidos, v. 56, n. 2, p. 144-151, abr. 2008.

RODRIGUES, P.O.; GONÇALVES T.C.; SILVA, W.B. Influência de Diferentes Sistemas de Solventes no Processo de Extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Acta Farm. Bonaerense,*v. 23, n. 1, p. 27-31, 2004.

ROSA, C. S. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica (G. Mey.) DC. Rev. bras. plantas med.*, v.18, n. 1, Botucatu, jan./mar. 2016.

SALVAGINI, L. E. et al., Avaliação da atividade antibacteriana de folhas *Myrtus communis L. (Myrtaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2. João Pessoa, abr./jun. 2008.

SANTI. M. M. et al. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea DC.* por HPLC-DAD. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.16, n.2, p.256-261, 2014.

SANTOS, A. J. S. *Efeitos da terapia com laser baixa potência em melanoma: ensaios in vitro*. 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. doi:10.11606/D.85.2012.tde-31052013-101630. Acesso em: 2019-12-16.

SANTOS, D. S. e RODRIGUES, M. M. R. *Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão.* Estação Científica (UNIFAP), [S.l.], v. 7, n. 3, p. 29-35, nov. 2017. ISSN 2179-1902. Disponível em: doi:http://dx.doi.org/10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35.<https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao/article/view/3639.> Acesso em: 02 nov. 2019.

SAUDE-GUIMARAES, D. A.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRA, A. B. Atividade antitumoral in vitro de lactonas sesquiterpenicas de Lychnophora. *Rev. bras. plantas med*., v.16, n.2, p.275-282, 2014.

SAVI, P.R.S. *et al.* Análise de flavonoides totais presentes em algumas frutas e hortaliças convencionais e orgânicas mais consumidas na região Sul do Brasil. *Demetra;*v. 12, n. 1, p. 275-287, 2017.

SCHMEDA-HIRSCHMAN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on Eugenia uniflora leaves: xanthine oxidade inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology,* v.21, p. 183-186, 1987.

SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. *Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: andbook of Inflammation*. Edited by Bonta, I.L., Bray, M.A. and Parnham, M.J. Elsevier, p. 27-47, 1985.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mecanismos da resposta inflamatória. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol,* 2004.

SERAFIN, C. et al. *Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antimicrobiano de Plínia glomerata.* In. Jornada Farmacêutica: Formação e Atuação, Anais. p.37, Itajaí, 2005.

SERAFIN, C. *Estudo da composição química e das propriedades biológicas das partes aéreas de Plínia glomerata.* 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

SERAFIN, C. *et al.;* Bioactive Phenolic Compounds from Aerial Parts of *Plinia glomerata. ZNaturforsch, CJ Biosci*., v. 62, n. 3-4, p. 196-200; mar./abr. 2007.

SILVA, A. N.; UETANABARO, A. P. T.; LUCCHESE, A. M., Composição química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Myrcia alagoensis* (Myrtaceae) *NPC Natural product Communications.*v.8, n.2, 269 -271, 2013.

SILVA, C. F.; OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S. Prospecção das redes de pesquisa em radioterapia no contexto da oncologia no Brasil. *Braz J Oncol*.,v. 14, n. 48,p. 1-13, 2018.
SILVA, G. A.; ISHIKAWA, T.; SILVA, M. A. *Projeto de implantação do horto de plantas medicinais da faculdade de ciências farmacêuticas.* 2011. 24 f. Universidade Federal de Alfenas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Alimentos e Medicamentos) Alfenas – Minas gerais, 2011.

SILVA, R.; *et al.,* Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from *Pseudobrickellia brasiliensis (Asteraceae). Journal of Essential Oil Research*, v.27, n.5, p.417-20, 2015.

SIMÕES *et al., Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Cap. 18. p. 467-495. 5 ed. Porto Alegre – Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

SIMÕES et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Cap. 18. p. 467-495. 6 ed. Porto Alegre – Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SIMÕES, R.L. et al. Lipoxin A_4 selectively programs the profile of M2 tumor-associated macrophages which favour control of tumor progression. *Intnternational Journal of Cancer*: VC 2016 UICC,v. 140, p. 346–357, 2017.

SINGH, S. *et al.* Initiative action of tumor-associated macrophage during tumor metastasis. *Biochimie open*., v.4, p.8-18, jun. 2017.

SOBRINHO et al., Vitamina C em “cabeludinha”. *Bragantia – Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo*, p. 193-201, v. 14, n. 19. Campinas, set. 1955.

SOUZA, C. *Filogenia molecular das jabuticabas: elucidando relações evolutivas e identidade genérica de um fruto genuinamente brasileiro.*2009. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasíla, Brasília – DF, 2009.

SOUSA, W. B. Criopreservação de células tronco e suas aplicações. *Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação*, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 45-56, dez. 2014. ISSN 2359-4748. Disponível em: <http://seer.uftm.edu.br/revistaeletronica/index.php/rbcti/article/view/737>. Acesso em: nov. 2019. doi:https://doi.org/10.18554/rbcti.v1i1.737.

TAIRA J., NANBU H., UEDA K. Nitric oxide-scavenging compounds in *Agrimonia pilosa* Ledeb on LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Food Chem*., v. 115, p. 1221–1227, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TAKATA, C. S. Suscetibilidade da linhagem de células Vero a cepas vacinais do vírus do sarampo. *Rev. Saúde Pública*, v. 28, n. 3, São Paulo, June 1994.

TAPPIN, M.R.R. et al. *Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de Eugenia jambolona de acordo com as frações de diferentes volatilidades.* In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 15, Águas de Lindóia, 1998, Anais.Águas de Lindoia, p.164 1998.

THEODOLUZ, C. *et al.* Xantine oxidase inhibitory activity of Paraguayan *Myrtaceae. Journal of Ethnopharmacology*.24, p. 179-183, 1988.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays basedon the Griess reaction: Appraisal of the Griess reactionin thel-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of chromatography B*,v. 851, p. 51-70, 2007.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA , L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 43, n. 4, São Paulo, Oct./Dec. 2007

VIJAYARATHNA, S ; SASIDHARAN, S. Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. *Asian Pac J Trop Biomed*.,v. 2, n. 10,p. 826–829, Oct. 2012.

VILELA, R. C. F. *Biologia reprodutiva e diversidade genética em jabuticabeiras (Myrciaria spp., Myrtaceae),* 2009. f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2009.

VILLAR, A. et al. Hypolaetin-8-O-glucoside, an anti-inflammatory flavonoid from *Sideritis mugronensis. Planta Med*., n. 1, p. 70, Feb. 1985.

WAGNER, H.; Bladt, S. Plant Drug Analysis, A Thin-Layer Chromatography *Atlas.Springer* Ed., 2ª Ed., Berlin, 2001.

WEI, S.; CHANG, A.; ZOU, W. Immune Suppression and Tumor Growth, *Cancer imumunoterapy.* p. 83-97, 2007.

WU, Y. *et al.* Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. *Cancer letters.* v. 345, cap2, p.164-73, abr. 2014.

YANG, Q. et al. Guaiol regulates RAD51 stability via autophagy to induce cell apoptosis in non-small cell lung câncer. *Oncotarget.*, v. 7, n. 38, p. 62585–62597, Sep. 2016.

YANG, X. *et al.* Guaiol regulates autophagic cell death depending on mTOR signaling in NSCLC. *Cancer Biol Ther*., v. 19, n. 8, p. 706–714, 2018.