



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LANA PEREIRA SOARES

**COMPARAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DA
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE EXTRATOS
DAS FOLHAS DE *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae)
OBTIDAS DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS**

Campinas
2020

LANA PEREIRA SOARES

**COMPARAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DA
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE EXTRATOS
DAS FOLHAS DE *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae)
OBTIDAS DE DIFERENTES PROCEDÊNCIAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestra em
Ciências, na Área de Fármacos,
Medicamentos e Insumos para Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA LANA PEREIRA SOARES E
ORIENTADA PELA DRA ANA LUCIA TASCAS GOIS
RUIZ.

Campinas
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

So11c Soares, Lana Pereira, 1994-
Comparação do perfil químico e da atividade antiproliferativa de extratos das folhas de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) obtidas de diferentes procedências / Lana Pereira Soares. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Ana Lucia Tasca Gois Ruiz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Casearia sylvestris*. 2. Diterpenos. 3. Compostos fenólicos. 4. Atividade antiproliferativa. I. Ruiz, Ana Lucia Tasca Gois, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparative study of chemical profile and antiproliferative activity of *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) leaves extracts obtained from different procedures

Palavras-chave em inglês:

Casearia sylvestris

Diterpenes

Phenolic compounds

Antiproliferative activity

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Ana Lucia Tasca Gois Ruiz [Orientador]

Fernanda Oliveira de Gaspari de Gaspi

Patricia Maria Wiziack Zago

Data de defesa: 20-01-2020

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7001-3398>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2319175128680706>

Campinas, 20 de Janeiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz

Profa. Dra. Patricia Maria Wiziack Zago

Profa. Dra. Fernanda Oliveira de Gaspari de Gaspi

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos da Unidade Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha avó Marly Teresinha Pereira pela inspiração, exemplo e amor.

AGRADECIMENTOS

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

Gostaria de iniciar os agradecimentos pela pessoa mais importante da minha vida: mamãe Claudia Pereira de Lacerda. Muito obrigada por ser quem você é. Pela paciência, pelos ensinamentos e por todo carinho e amor. Obrigada por ter se preocupado, desde sempre, com minha educação e por ter me despertado a curiosidade e paixão pelos estudos. Agradeço ainda por ter me motivado a realizar a pós-graduação, seu incentivo foi muito importante para mim

Agradeço à minha avó Marly Teresinha Pereira, por ter servido de inspiração e por ter me apresentado à vida acadêmica e ao maravilhoso mundo das plantas medicinais. Você sempre foi, é e continuará sendo, minha referência profissional.

À minha tia e madrinha, Renata Pereira de Lacerda e à minha avó Maria Nice Pagotto Soares, por todo apoio, investimento, carinho, amor e cuidado. Ao meu pai Fabio Augusto Soares pela parceria e amizade. Obrigada por terem contribuído tão fortemente com a minha criação e educação.

Às minhas amigas-irmãs Bruna Garbim, Camila Pompermayer e Aline Borges pelos longos anos de amizade, suporte e parceria. À Letícia Lucke, Stephanie Von Eye e Thiago Nunes por estarem ao meu lado desde a graduação.

À melhor orientadora do mundo, Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, por ter aceitado me orientar e por todo conhecimento compartilhado com muito carinho e paciência durante todo o percurso. Obrigada por ser minha mãe acadêmica na família LAFTEX, pelos conselhos e orientações que foram, muitas vezes, além da vida universitária.

À família LAFTEX: Mary Ann e Ilza pelo carinho, contribuição e pelos ensinamentos que foram muito importantes para elaboração deste trabalho. Lucia, pela amizade, paciência e perseverança de me auxiliar nos inúmeros ensaios com células. Aline, Dayana, Kaio, Natalia, Camila, Marcos, Rogério e Julia pela parceria, ajuda e pelos bons momentos e risadas no

laboratório. Agradeço ainda à Núbia, Karin, Akila, João Ernesto, Gisele e Ordilena pelo trabalho em equipe realizado. Vocês são incríveis.

Às doutoras Patrícia Zago, Cristina Pontes e Paula Paiva pelas valiosas contribuições.

Ao pessoal de Farmacobotânica, meus colegas PED Victor, Carlos e Felipe, e professores Marília, Eliana e Marcos.

À Prof. Dra. Taícia Fill e Jaque pelo suporte e auxílio oferecidos no Instituto de Química.

Aos técnicos de laboratório Arthur, Débora e Matheus.

Ao pessoal da limpeza e manutenção, a faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e a todos os professores que contribuíram com a minha formação.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado. Muito obrigada!

RESUMO

Os produtos naturais são uma importante fonte de drogas antitumorais, sendo que mais da metade dos fármacos utilizados na terapia anticâncer, atualmente, tem sua origem em moléculas isoladas de plantas, microrganismos ou animais marinhos. Além de serem utilizados para o tratamento de doenças, os produtos naturais também são frequentemente relatados como agentes preventivos eficientes. Estudo inicial do nosso grupo de pesquisa avaliou em um painel de células tumorais humanas os extratos hidroetanólicos 70% de três plantas brasileiras utilizadas na medicina tradicional, a saber, folhas de *Casearia sylvestris*, folhas de *Maytenus ilicifolia* e cascas do caule de *Handroanthus impetiginosus*. Esse estudo evidenciou uma promissora atividade antiproliferativa para o extrato das folhas de *C. sylvestris* corroborando os relatos da literatura para o potencial das partes aéreas de *C. sylvestris* no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer. O presente trabalho buscou realizar a comparação do perfil químico e da atividade antiproliferativa de folhas de *C. sylvestris* obtidas de diferentes procedências. Para tanto, foram coletadas folhas de um espécime de *C. sylvestris* cultivado no *campus* da UNICAMP, Campinas, SP, e foram adquiridas duas amostras em comércios especializados (ervanarias) localizadas respectivamente nas cidades de Campinas, SP e Piracicaba, SP. Após a seleção do método de extração, as três amostras foram submetidas a extração sucessiva com diclorometano e etanol 70% ou extração direta em etanol 70%, sempre através do método de turbolização. Nesta etapa, uma das amostras (ervanaria, Campinas) foi perdida por contaminação fúngica. Através de técnicas cromatográficas (cromatografias em camada delgada e líquida de alta eficiência) e colorimétricas (análise de compostos fenólicos totais), foi possível evidenciar a presença de substâncias terpênicas e fenólicas nos extratos de folhas de *C. sylvestris*, sendo a amostra coletada no *campus* Unicamp/Barão Geraldo a que apresentou maior teor de substâncias terpênicas enquanto a adquirida em ervanaria mostrou-se mais enriquecida em compostos fenólicos. Essas diferenças são compatíveis com os relatos para a composição química de *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua*, respectivamente, que também refletiu- em diferenças significativas nos efeitos farmacológicos. Ou seja, o extrato com maior teor de terpenos, além de uma atividade antiproliferativa mais potente, manteve o efeito inibitório mesmo após sua retirada do meio de cultivo (efeito antiproliferativo não reversível). Por outro lado, o extrato com menor teor de terpenos, apesar do efeito antiproliferativo inicial, apresentou efeito proliferativo residual, o qual poderia ser atribuído, parcialmente, às lignanas já identificadas e descritas em *C. sylvestris*. Desta forma, evidenciou-se a importância da correta denominação botânica de uma espécie vegetal, incluindo a designação de variedade, para a comercialização de drogas vegetais a fim de que os usuários de plantas medicinais possam usufruir adequadamente dos efeitos terapêuticos que cada espécie pode proporcionar.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*, diterpenos, compostos fenólicos, atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

Natural products are an important source of antitumoral drugs and more than half of the drugs used in anticancer therapy, today, were originate from molecules isolated from plants, microorganisms or marine animals. In addition to the use for disease treatment, natural products are also reported as effective preventive agents. An initial study of our research group evaluated in panel of human tumor cells hydroethanolic extracts 70% of three Brazilian plants used in traditional medicine, leaves of *Casearia sylvestris*, leaves of *Maytenus ilicifolia* and stem bark of *Handroanthus impetiginosus*. This study evidenced a promising antiproliferative activity for *C. sylvestris* leaf extract corroborating the literature reports about the potential of *C. sylvestris* aerial parts in the development of new therapeutic strategies for cancer treatment. The present work aimed to compare the chemical profile and antiproliferative activity of *C. sylvestris* leaves obtained from different origins. For that, leaves were collected from a specimen of *C. sylvestris* cultivated at the campus of UNICAMP, Campinas, SP, and two samples were obtained from specialized trades (herbalists) located respectively in the cities of Campinas, SP and Piracicaba, SP. After selecting the extraction method, the three samples were submitted to successive extraction with dichloromethane and 70% ethanol or direct extraction in 70% ethanol, always through turbolization method. At this stage, one of the samples (Herbal Shop, Campinas) was lost due to fungal contamination. Through chromatographic techniques (thin layer chromatography and liquid chromatography of high efficiency) and colorimetric (analysis of total phenolic compounds), it was possible to evidence the presence of terpenic and phenolic substances in the extracts of *C. sylvestris* leaves, where the sample collected on campus Unicamp/Barão Geraldo presented higher terpene content while that obtained in herbal shop was more enriched in phenolic compounds. These differences are consistent with reports for the chemical composition of *C. sylvestris* var. *sylvestris* and *C. sylvestris* var. *lingua* respectively. This variation was reflected in significant differences in pharmacological effects. In other words, the extract with higher terpene content, besides presenting more potent antiproliferative activity, maintained the inhibitory effect even after its removal from the culture medium (non-reversible antiproliferative effect). On the other hand, the extract with lower terpene content, despite the initial antiproliferative effect, showed residual proliferative effect, which could be partially attributed to the lignans already identified and described in *C. sylvestris*. Thus, the importance of the correct botanical denomination of a plant species, including the variety designation, was evidenced for the commercialization of plant drugs so that medicinal plant users can properly enjoy the therapeutic effects that each species can provide.

Keywords: *Casearia sylvestris*, diterpenes, phenolic compounds, antiproliferative activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema geral do estudo realizado com amostras das partes aéreas de <i>C. sylvestris</i> obtidas de fontes distintas.	27
Figura 2 - Fluxograma do processo de extração das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> .	29
Figura 3 - Desenho experimental da placa de 96 compartimentos utilizada na análise do teor de fenólicos totais.	31
Figura 4 - Desenho experimental da placa controle T0 contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.	36
Figura 5 - Desenho experimental da placa de 96 compartimentos do teste de avaliação de atividade antiproliferativa in vitro, para cada linhagem testada.	36
Figura 6 - Desenho experimental do plaqueamento, em placas de 6 compartimentos, das células tratadas em garrafas T25 com duas concentrações de extratos elaborados a partir de duas amostras de folhas de <i>Casearia sylvestris</i> de diferentes procedências.	39
Figura 7 - Desenho experimental da placa de 12 compartimentos do teste de avaliação de atividade (anti)estrogênica – Modelo <i>E-screen</i> .	40
Figura 8 - Coloração do extrato e aspecto do resíduo vegetal das folhas de <i>C. sylvestris</i> obtidos pelos diferentes métodos de extração avaliados.	42
Figura 9 - Extratos obtidos pelo método de turbolização com Ultraturrax® com extração sucessiva com DCM (esquerda) seguida de EtOH 70% (centro) ou diretamente em EtOH 70% (direita) de folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências, antes da evaporação dos solventes.	43
Figura 10 - Aspecto da reação de Folin-Ciocalteu para quantificação do teor de fenólicos totais nos extratos das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> de diferentes procedências.	44
Figura 11- Teor de fenólicos totais ($\mu\text{g GAE/mg}$) dos extratos etanólicos, sucessiva e total, das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências.	45
Figura 12 - Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências utilizando fase móvel de média/alta polaridade.	46

Figura 13 - Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências utilizando fase móvel de média/baixa polaridade	47
Figura 14 - Cromatogramas de quercetina (padrão de flavonoide) obtido por HPLC/UV-VIS e registrado em 254 nm (representada pela cor vermelha) e 235 nm (representada pela cor preta).	48
Figura 15 - Cromatogramas, obtidos por HPLC/UV-VIS, dos seis extratos obtidos das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências, em coluna C18 e registrados em 254 nm (representada pela cor vermelha) e 235 nm (representada pela cor preta).	49
Figura 16 - Cromatogramas, obtidos por HPLC/UV-VIS, dos seis extratos obtidos das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências, em coluna CN e registrados em 254 nm (representada pela cor vermelha) e 235 nm (representada pela cor preta).	50
Figura 17 - Atividade antiproliferativa dos quimioterápicos Doxorrubicina e Tamoxifeno (controle positivo) após 48 h de exposição.	52
Figura 18 - Atividade antiproliferativa das amostras A1, A2 e A3 obtidas das partes aéreas de <i>C. sylvestris</i> coletada no campus da UNICAMP, Campinas, SP, após 48 h de exposição.	53
Figura 19 - Atividade antiproliferativa das amostras B1, B2 e B3 obtidas das partes aéreas de <i>C. sylvestris</i> adquirida em ervaçaria da cidade de Piracicaba, SP, após 48 h de exposição.	54
Figura 20 - Formação de colônias de células MCF7 incubadas por 10 dias após 48 h de exposição aos extratos diclorometano obtidos das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências.	55
Figura 21 - Comparação entre cromatogramas gerados nas análises de folhas de <i>C. sylvestris</i> obtidas de diferentes procedências.	63
Figura 22 – Imunohistoquímica representativa para os receptores ER, PR e HER2 nas linhagens tumorais de células mamárias humanas, MCF-7 (ER+), MCF-7/AZ (ER+, PR+) e MDA-MB-231 (triplo negativo).	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas do óleo essencial de <i>Casearia sylvestris</i> encontradas na literatura.	22
Tabela 2 - Atividades biológicas de extrato de <i>Casearia sylvestris</i> encontradas na literatura.	23
Tabela 3 - Preparação da curva de calibração de ácido gálico para análise do teor de fenólicos totais.	30
Tabela 4 - Linhagens celulares tumorais e não tumorais (imortalizadas) humanas utilizadas nos estudos <i>in vitro</i> .	31
Tabela 5 - Rendimento dos processos de extração de folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências.	44
Tabela 6 - Teor de fenólicos totais ($\mu\text{g GAE/mg}$) nos diferentes extratos obtidos das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências.	45
Tabela 7 - Atividade antiproliferativa, expressa como concentração necessária para inibir totalmente a proliferação celular (TGI, $\mu\text{g/mL}$), extratos obtidos das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências	51
Tabela 8 - Número de colônias formadas, eficiência de plaqueamento (E.P.) e fração sobrevivente (F.S.) de células MCF7 incubadas por 10 dias após 48 h de exposição aos extratos diclorometano obtidos das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências.	56
Tabela 9 - Efeito (anti)estrogênico dos extratos diclorometano obtidos das folhas de <i>C. sylvestris</i> de diferentes procedências em células MCF-7 seguindo o protocolo <i>E-screen</i> .	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Câncer	17
2.2 Plantas medicinais	18
2.2.1 <i>Casearia sylvestris</i>	19
3 PROPOSIÇÃO	26
3.1 Geral	26
3.2 Específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Material Vegetal	28
4.2 Preparação dos Extratos	28
4.2.1 Análise do Teor de Fenólicos Totais	30
4.2.2 Análise Qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	32
4.2.3 Análise Qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector UV/VIS (HPLC-UV)	32
4.3 Avaliação Farmacológica <i>in vitro</i>	34
4.3.1 Avaliação Farmacológica em Cultura de Células	34
4.3.1.1 Linhagens Celulares	34
4.3.1.2 Preparação das Amostras	35
4.3.1.3 Avaliação de Atividade Antiproliferativa	35
4.3.1.3. Teste Clonogênico	38
4.3.1.5 Avaliação de Atividade (Anti)Estrogênica - Modelo <i>E-screen</i>	40
4.4 Análises Estatísticas	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Estudo Fitoquímico	42
5.1.1 Teor de Fenólicos totais	44
5.1.2 Análise Qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	46
5.1.3 Análise Qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector UV/VIS (HPLC-UV)	48
5.2 Estudo Farmacológico <i>in vitro</i>	51
5.2.1 Atividade Antiproliferativa em Painel de Células Tumorais	51
5.2.2 Teste Clonogênico	55
5.2.3 Efeito (Anti) Estrogênico <i>in vitro</i> – Teste <i>E-screen</i>	57

6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
Anexo 1 – Análise de plágio – Turnitin	85
Anexo 2 – Cadastro no SisGen	86
Anexo 3 – Declaração de direito autoral	87

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, abrigando aproximadamente 20% do número total de espécies da Terra (Brasil, 2017). Por possuir uma das biotas mais ricas, o país apresenta uma fonte de oportunidades em inúmeras vertentes de pesquisa, em especial as pesquisas científicas e tecnológicas dos produtos naturais (Buenz, Verpoorte & Bauer, 2018).

A Organização Mundial da Saúde/*World Health Organization* (OMS/WHO) incentiva o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, através da publicação de monografias (WHO, 1999 - 2010), guias de boas práticas para cultivo agrícola e coleta (WHO, 2003) e de farmacovigilância de fitoterápicos (WHO, 2004), com o objetivo de avaliar cientificamente os riscos e os benefícios da utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos (De Araujo *et al.*, 2017).

Dentro deste contexto, a natureza continua sendo uma importante fonte de novas estruturas com potencial para tratamento de diversas doenças. Os produtos naturais são considerados importante fontes de drogas antitumorais, tendo como exemplo o taxol e a doxorubicina, entre outras drogas provenientes de produtos naturais e atualmente utilizadas na terapia anticâncer. Além de serem utilizados para o tratamento de doenças como o câncer, os produtos naturais derivados de plantas são frequentemente relatados como agentes quimiopreventivos eficientes (Cragg & Newman, 2013; Song *et al.*, 2014).

Uma revisão de literatura recente realizada por Cragg & Newman (2016) evidencia o papel fundamental que a natureza desempenha neste processo: cerca de 77% das moléculas aprovadas para o tratamento do câncer são de origem natural ou inspiradas em algum produto natural.

É de grande importância, para todas as ciências que investigam a relação pessoas/plantas, registrar e conhecer as estratégias e conhecimentos dos povos locais, buscando utilizar essas informações em benefício dessas pessoas e da sociedade. Assim, a etnobotânica e a etnofarmacologia visam o estudo das inter-relações ser humano-planta de uma comunidade, resgatando as informações passadas de uma geração para outra, valorizando o conhecimento tradicional dos povos e a utilização prática das plantas (Lopez, 2011; Anselmo *et al.*, 2012).

Entre as espécies vegetais nativas e de uso etnofarmacológico encontra-se a *Casearia sylvestris* Sw., citada na “Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS” (RENISUS) onde constam 71 espécies que podem atender às doenças com maior incidência no Brasil (BRASIL, 2006).

Estudo inicial do nosso grupo de pesquisa avaliou em painel de células tumorais humanas, extratos hidroetanólicos 70% de três plantas brasileiras utilizadas tradicionalmente, a saber, *Casearia sylvestris*, *Maytenus ilicifolia* e *Handroanthus impetiginosus*, coletadas no *campus* da ESALQ/USP, na cidade de Piracicaba, SP e no *campus* da FHO/UNIARARAS, na cidade de Araras, SP. As análises demonstraram que o extrato de *C. sylvestris* foi ativo para todas as linhagens avaliadas, apresentando atividade moderada para as linhagens tumorais de rim (786-0), mama (MCF-7), glioma (U251), melanoma (UACC-62), ovário (OVCAR-3) e leucemia (K562) e atividade fraca contra as linhagens tumorais de cólon (HT29), ovário com fenótipo de resistência (NCI-ADR/RES), pulmão (NCI-H460) e contra a linhagem imortalizada de queratinócitos humanos (HaCaT). Os demais extratos foram inativos. Os resultados foram concordantes com estudos da literatura que apontam para grande potencial das partes aéreas de *C. sylvestris* no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer (Soares, Gaspi & Ruiz, 2015).

Neste contexto, o presente estudo objetivou a ampliação das análises com a espécie *Casearia sylvestris*. Neste trabalho, foram preparados extratos de três diferentes amostras de *C. sylvestris*, sendo uma coletada no *campus* da UNICAMP, Campinas, SP e outras duas obtidas em comércios (ervanarias) localizadas respectivamente nas cidades de Campinas, SP e Piracicaba, SP, para a comparação de perfil químico e das possíveis ações farmacológicas dos diferentes materiais vegetais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019), câncer é o nome que define um conjunto de mais de cem doenças que possuem como característica comum o crescimento desorganizado de células que invadem tecidos e órgãos. Estas células dividem-se rapidamente e tendem a ser muito agressivas, formando tumores que podem espalhar-se para outras regiões do corpo.

A exposição a diferentes agentes cancerígenos e fatores genéticos hereditários, associados ou não, podem levar a alterações no DNA celular, as quais podem resultar em alterações nos processos celulares. A partir dessa iniciação, as células alteradas podem ou não evoluir para uma massa tumoral com características de invasão tecidual. Esse processo é conhecido como carcinogênese e pode ser dividido, didaticamente, em iniciação, promoção e progressão do câncer (INCA, 2019).

No Brasil, a estimativa para o biênio 2018-2019 indica a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, os tumores mais incidentes em mulheres e homens serão, respectivamente, os cânceres de mama (59.700 casos novos/ano) e de próstata (68.220 casos novos/ano) seguindo uma tendência mundial (INCA, 2018).

As principais estratégias para o tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Todas elas, em maior ou menor grau, produzem efeitos colaterais indesejados que variam de acordo com o sexo, a idade, o local da neoplasia e o tempo de tratamento do paciente (Arisawa *et al.*, 2005). Mesmo a quimioterapia alvo-dirigida, se por um lado minimizou a incidência de efeitos colaterais usuais, relacionados à ação sobre células normais em rápida divisão celular como queda de cabelo e imunossupressão, por outro também apresenta efeitos colaterais que precisam ser considerados no delineamento do protocolo de tratamento (Arisawa *et al.*, 2005).

A grande incidência da doença, os efeitos adversos resultantes do tratamento e a possibilidade de reincidência do tumor fazem do câncer um grande problema de saúde pública, sendo necessária a continuidade dos estudos que visam o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento desta doença (Song *et al.*, 2014; Siegel *et al.*, 2016). Pensando em reduzir a quantidade de efeitos colaterais provocados pelo tratamento faz-se necessário o

desenvolvimento de drogas mais seletivas que possam matar células tumorais sem afetar as células normais (Khazir *et al.*, 2014).

2.2 Plantas medicinais

Além das substâncias do metabolismo primário, as células vegetais produzem uma grande variedade de metabólitos secundários. Esses metabólitos são sintetizados pelas plantas com a finalidade de interagirem com os demais organismos presentes no ambiente. Assim, essas substâncias podem atuar como defesa contra herbívoros e patógenos ou ainda para atração de agentes polinizadores (Brusotti *et al.*, 2014). Ainda, os extratos vegetais podem conter produtos naturais derivados de organismos endofíticos ou metabólitos produzidos pelas plantas como resultado da interação com estes microrganismos (Bernardini *et al.*, 2017). Esses metabólitos podem ser agrupados em três famílias químicas principais: alcaloides, terpenóides e compostos fenólicos (Brusotti *et al.*, 2014), que trabalham sinergicamente ou individualmente para fornecer efeitos terapêuticos (Suntar, 2019).

A composição dos metabólitos secundários de uma planta depende de muitos fatores como identidade da espécie, época da colheita, composição do solo, altitude, condições climáticas, condições de posse e armazenamento. Essas substâncias normalmente estão presentes em baixa quantidade no material vegetal e sua extração, purificação e caracterização são desafios no processo de descoberta de medicamentos (Brusotti *et al.*, 2014).

Em função de sua diversidade química, inúmeros produtos naturais exibem atividades farmacológicas, as quais explicam o uso milenar das plantas para fins medicinais. Assim, inúmeras pesquisas científicas buscaram conhecer quimicamente essas substâncias empregando métodos de triagem e isolamento monitorados por testes biológicos. A partir da identificação desses compostos, diversos estudos de síntese química foram realizados para a obtenção com pureza, eficácia, potência e segurança aprimoradas das moléculas-alvo e seus derivados. Desta forma, uma grande parte do arsenal terapêutico disponível atualmente foi construído (Cragg & Newman, 2013; Brusotti *et al.*, 2014; Suntar, 2019). Em paralelo, vários estudos demonstraram que, em muitas situações, os extratos vegetais eram mais ativos do que os compostos isolados dos mesmos. Esses resultados sugeriram possíveis efeitos sinérgicos entre as substâncias o que incentivou o desenvolvimento de fitoterápicos seguros e com custos relativamente menores do que os de medicamentos preparados com moléculas isoladas (Bernardini *et al.*, 2018).

Considerando-se tanto o uso das plantas medicinais como fonte de moléculas bioativas quanto o uso como fitoterápicos e em preparações extemporâneas, o primeiro passo para o uso

adequado e seguro de uma planta medicinal é a correta identificação da espécie vegetal. Isso deve ser feito a partir da preparação de exsiccatas do espécime no momento da coleta, as quais são depositadas em herbários e podem servir como material testemunha para coletas futuras. No caso de material vegetal seco e moído, estudos microscópicos e de DNA podem evidenciar características particulares de cada espécie auxiliando na correta identificação. Todas essas etapas devem ser conduzidas por especialistas e são primordiais para evitar o uso errôneo de plantas que macroscopicamente podem ser bastante parecidas (Kellogg *et al.*, 2019).

2.2.1 *Casearia sylvestris*

Casearia sylvestris Sw. foi descrita pela primeira vez em 1797 por Swartz na acta “Flora Indiae Occidentalis”, acrescentada na obra “Flora Brasiliensis”, de Carl Friedrich Philipp von Martius (1871). Inicialmente classificada na família Bixaceae (Santos, 2008), atualmente o gênero *Casearia* é descrito na família Salicaceae (antiga Flacourtiaceae) (Lorenzi & Matos, 2008). Conhecida popularmente como "guaçatonga", "apiá-acanoçu", "bugre-branco" e “café-bravo” dentre outros, *C. sylvestris* é amplamente distribuída pelo Brasil (Lorenzi & Matos, 2008), sendo a espécie mais estudada do gênero *Casearia* Jacq, devido ao seu uso na medicina popular (Bueno *et al.*, 2016).

Uma grande variedade de sinônimas botânicas pode ser encontrada na literatura para esta espécie. São elas: *C. affinis* Gardner, *C. attenuata* Rusby, *C. cambessedesii*, *C. capitata* (Ruiz et Pavon) Spreng., *C. caudata* Uitt., *C. chlorophoroidea* Rusby, *C. ekmanii* Sleumer, *C. formosa* Urban, *C. herbert-smithii* Rusby, *C. lindeniana* Urban, *C. lingua* Cambessèdes, *C. oblongifolia*, *C. onacaensis* Rusby, *C. ovoidea* Sleumer, *C. parviflora* Wild., *C. punctata* Spreng., *C. samyda* (Gaert.) D.C., *C. schulziana* Schimidt, *C. sessiliflora* Lund., *Anavinga samyda* Gaertn., *Chaetocrater capitatum* Ruiz et Pavon, *Crateria capitata* (Ruiz et Pavon) Person, *Guidonia sylvestris* (Swartz) Maza, *Samyda parviflora* L., *Samyda sylvestris* (Swartz) Poiret (Santos, 2008).

Segundo a base de dados *Tropicos* (2018), do *Missouri Botanical Garden*, a espécie *C. sylvestris* apresenta 15 variedades, 2 sub-variedades e 2 sub-espécies, sugerindo que a mesma possui grande plasticidade adaptativa a variações ambientais.

Uma vez que variações ambientais podem resultar em diferenças no perfil de metabólitos secundários, Bueno e colaboradores (2015) avaliaram o perfil químico dos extratos das folhas de duas variedades de *C. sylvestris* presentes no estado de São Paulo, Brasil. Assim, as folhas de *C. sylvestris* var. *língua*, predominantemente encontrada na forma de arbustos (com

folhas pequenas, coriáceas, de coloração verde clara) em habitats abertos, forneceram extratos ricos em compostos fenólicos. Por sua vez, as folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris*, predominantemente apresentada na forma de árvores com altura superior a 2 metros (com grandes folhas verdes escuras), encontrada em florestas úmidas e densas, forneceram extratos ricos em diterpenos de tipo clerodano.

Um levantamento bibliográfico foi feito nas bases de dado Bireme (Lilacs e Scielo), Pubmed (Medline), Scopus, Web of Science e Embase com o intuito de verificar o que já havia sido estudado a respeito da utilização etnofarmacológica, da composição química e das atividades farmacológicas comprovadas de partes de *Casearia sylvestris*.

Com base nesse levantamento, foi possível evidenciar a utilização do decocto das folhas de *C. sylvestris* para controle dos níveis de colesterol por populares no município de São João do Polêsine, RS, Brasil (Dorigoni *et al.*, 2001), para tratamento de anemia por moradores da comunidade Sítio Pindura, na cidade de Rosário Oeste – MT (Moreira & Guarim-Neto, 2009; Pinto *et al.*, 2013) e para melhora da imunidade por vendedores no mercado do Porto em Cuiabá – MT (Pinto *et al.*, 2013). Outro levantamento das plantas medicinais usadas por moradores de uma comunidade localizada no bairro de Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, constatou a utilização popular de infusões feitas a base de folhas e ramos de *C. sylvestris* como cicatrizante, digestivas, diuréticas, normalizadora da pressão arterial, contra má circulação do sangue, para o coração, como emagrecedora, para tratamento de alergias e coceiras, contra tosse, contra a gripe e no tratamento de reumatismos (Vendruscolo *et al.*, 2005).

Já entre os relatos de uso por populações indígenas, foram encontrados o uso de macerados ou decoctos da casca de *C. sylvestris* para tratamento de diarreia por índios da tribo Karajá (Brasil) e para tratamento de resfriados e gripes por índios da tribo Shipibo-conibo (Peru). Já as raízes ou sementes trituradas são utilizadas para tratamento de feridas, lepra tópica e como antiofídico por várias tribos indígenas brasileiras (Da Silva *et al.*, 2008). Além disso, a tribo Xucuru do estado de Pernambuco, utiliza extrato das folhas de *C. sylvestris* como antiinflamatório no tratamento de doenças venéreas, doenças do útero e dos ovários (Yazbek *et al.*, 2016). Atribui-se ainda às folhas de *C. sylvestris* ações tônica, depurativa, antirreumática, antiofídica, antidiarreica, entre outras, sendo catalogada como planta medicinal de interesse ao Sistema Único de Saúde no Brasil (Ameni, 2015).

Embasados por levantamentos etnofarmacológicos, diversos estudos científicos, *in vitro* e *in vivo*, comprovam que tanto o óleo essencial e quanto extratos das folhas de *C. sylvestris* apresentam atividades farmacológicas que sustentam a eficácia de sua utilização popular. Foram encontrados 9 artigos que relatavam atividades farmacológicas do óleo essencial das

folhas de *C. sylvestris*, sendo elas antitumoral (3), antimicrobiana (2), efeito gastroprotetor/antiulcerativo (1), efeitos clastogênicos/anticlastogênicos (1), antiparasitária (1) e antioxidante (1) (Tabela 1).

Com relação à composição química do óleo essencial das folhas de *C. sylvestris*, os relatos encontrados (Tabela 1) parecem sugerir uma variação em função da localização do espécime em estudo. Mas este não parece ser o único fator a influenciar a composição química. Um estudo avaliou a influência do período da coleta das folhas de *C. sylvestris* sobre a composição do óleo essencial. Assim, tanto as folhas coletadas pela manhã quanto as coletadas à tarde resultaram em óleo essencial com predomínio de germacreno-D (entre 66 e 70%) e germacreno-B (entre 10 e 20%). A variação ocorreu nos sesquiterpenos minoritários (entre 5 e 1%), sendo que no óleo obtidos das folhas coletadas pela manhã apenas β -selineno e longifoleno foram identificados, enquanto no óleo essencial obtido a partir das folhas coletadas no período da tarde foram identificados β -selineno, biciclogermacreno, longifoleno, γ -muuruleno, γ gurjeno, δ -cadineno e β -gurgeneno, sugerindo uma possível indução fotoquímica no rearranjo de sesquiterpenos (Taninis *et al.*, 2006).

Por sua vez, foram encontrados 50 artigos de estudos com extratos das folhas e/ou partes aéreas, os quais relatavam atividade antitumoral (11), atividades ligadas a modulação da dor (6), atividade antiparasitária (5), anti-obesidade/efeito cardioprotetor (4), atividade antimicrobiana (5), atividade antioxidante (4), efeito antiinflamatório (3), efeito gastroprotetor/antiulcerativo (2), atividade cicatrizante (2), antiofídico (2), atividade antihiperlipidêmico (1) e atividade imunomoduladora (1) (Tabela 2). Ainda, foram encontrados 6 artigos que avaliaram os efeitos de toxicidade do extrato ou de substâncias isoladas desta espécie.

Tabela 1- Atividades biológicas do óleo essencial de *Casearia sylvestris* encontradas na literatura

Local da Coleta	Composição do Óleo Essencial (% relativa)	Atividade	Referência
Rio de Janeiro - SP, Brasil	α -humuleno (17.8 %) spathulenol (11.8 %) α -copaeno (8.5 %)	Antifúngica, Antitumoral	Pereira <i>et al.</i> , 2017a. Pereira <i>et al.</i> , 2017b.
São Paulo - SP, Brasil	α -zingibereno (48.3 %) β -cariofileno (14.2 %) γ -muuroleno (5.1 %) viridifloreno (5.0 %)	Antitumoral	Bou <i>et al.</i> , 2013.
Campinas - SP, Brasil	biciclogermacreno (43.6 %) β -cariofileno (18.1 %) α -humuleno (15.9 %) germacreno B (5.2 %)	Antitumoral	Da Silva <i>et al.</i> , 2008.
Alfenas - MG, Brasil	biciclogermacreno (40,9 %) β -acoradieno (20,8 %) spathulenol (12,6 %) thujopseno (5,2 %)	Anti-inflamatório	Esteves <i>et al.</i> , 2011.
Cascavel - PR, Brasil	diidrocarveol (27,6 %) β -cariofileno (21,5 %) cadineno (18.5 %)	Antimicrobiano	Nogueira Diaz <i>et al.</i> , 2009.
Chapecó - SC, Brasil	β -cariofileno (27.5 %) biciclogermacreno (24.2 %)	Efeito clastogênico/ Anticlastogênico	Sousa <i>et al.</i> , 2007.
Alfenas - MG, Brasil	biciclogermacreno (40.9 %) β -acoradieno (20.8 %) β -cariofileno (13.8 %) spathulenol (12.6 %) thujopseno (5.2 %)	Anti-ulcerogênico Anti-inflamatório	Esteves <i>et al.</i> , 2005.
Araraquara - SP, Brasil	β -cariofileno (22.2 %) germacreno D (19.6 %) biciclogermacreno (12.2 %) isoledeno (9.0 %) δ -cadineno (6.6 %)	Antiparasitário	Moreira <i>et al.</i> , 2019.

Fonte: A autora.

Tabela 2 - Atividades biológicas de extrato de *Casearia sylvestris* encontradas na literatura.

Atividade	Tipo do Extrato	Parte Utilizada	Referências
Antitumoral	Etanólico	Folhas	Da Silva <i>et al</i> , 2009.
	Hexânico	Folhas, raízes e casca	De Mesquita <i>et al</i> , 2009.
	Etanólico	Folhas	Dos Santos <i>et al</i> , 2010.
	Hidroetanólico	Folhas	Felipe <i>et al</i> , 2014.
	Etanólico	Folhas	Ferreira <i>et al</i> , 2010.
	Etanólico	Folhas	Ferreira <i>et al</i> , 2014.
	Etanólico	Folhas	Ferreira <i>et al</i> , 2016.
	Metanólico	Folhas	Ferreira-Silva <i>et al</i> , 2017.
	Etanólico	Folhas	Prieto <i>et al</i> , 2012.
Etanólico	Folhas	Prieto <i>et al</i> , 2013.	
Modulação da dor	Aquoso	Partes aéreas	Da Silva <i>et al</i> , 2006.
	Etanólico	Folhas	De Araújo <i>et al</i> , 2017.
	Hidroalcoólico	Folhas	De Mattos <i>et al</i> , 2007.
	Hidroalcoólico	Folhas	Piovezan <i>et al</i> , 2017.
	Hidroalcoólico	Folhas	Werner <i>et al</i> , 2015.
	Fração Metanólica	Folhas	Yoshida <i>et al</i> , 2016.
Antiparasitário	Metanólico	Folhas	Antinarelli <i>et al</i> , 2015.
	Metanólico	Folhas	Bou <i>et al</i> , 2014.
	Hexânico	Folhas, raízes e casca	De Mesquita <i>et al</i> , 2005.
	Hexânico	Folhas, raízes e casca	De Mesquita <i>et al</i> , 2007.
	Etanólico	Folhas	Slomp <i>et al</i> , 2009.
Anti-obesidade /Cardioprotetor	Etanólico	Folhas	Espinosa <i>et al</i> , 2015.
	Hidrometanólico (70%)	Folhas	Frediani <i>et al</i> , 2014.
	Metanólico	Folhas	Schoenfelder <i>et al</i> , 2008.
	Hidroalcoólico	Folhas	Werle <i>et al</i> , 2009.

Tabela 2 – cont.

Atividade	Tipo do Extrato	Parte Utilizada	Referências
Antimicrobiano	Etanólico	Folhas	DA SILVA <i>et al</i> , 2008.
	Etanólico	Folhas	ESPINOSA <i>et al</i> , 2015.
	Etanólico	Folhas	RAMOS <i>et al</i> , 2008.
	Etanólico	Folhas	Spósito <i>et al</i> , 2019.
	Aquoso	Folhas	Tavares <i>et al</i> , 2008.
Antioxidante	Hidroalcoólico	Folhas	Albano <i>et al</i> , 2013.
	Etanólico	Folhas	De Araújo <i>et al</i> , 2015.
	Etanólico	Folhas	Espinosa <i>et al</i> , 2015.
	Hidroalcoólico	Folhas	Menezes <i>et al</i> , 2004.
Antiinflamatório	Hidroalcoólico	Folhas	Albano <i>et al</i> , 2013.
	Hexânico e etanólico	Folhas, Casca, Caule e Raízes	Napolitano <i>et al</i> , 2005.
	Etanólico	Folhas	Pierri <i>et al</i> , 2017.
Gatroprotetor/ Antiulcerativo	Etanólico	Folhas	Fialho <i>et al</i> , 2010.
	Etanólico	Folhas	Flausino <i>et al</i> , 2009.
Cicatrizante	Hidroalcoólico	Folhas	De Campos <i>et al</i> , 2015.
	Aquoso	Partes aéreas	Lipinski <i>et al</i> , 2012.
Antiofídico	Aquoso	Folhas	Cavalcante <i>et al</i> , 2007.
	Aquoso	Partes aéreas	De Paula <i>et al</i> , 2010.
Imunomodulador	Etanólico	Folhas	Gusman <i>et al</i> , 2015.
Antihiperlipidêmico	Aquoso	Folhas	Buccioli <i>et al</i> , 2012.

Fonte: A autora.

Investigações fitoquímicas do gênero *Casearia* permitiram a identificação de mais de 285 compostos, incluindo terpenóides, esteróides, fenilpropanóides e flavonóides (Bueno *et al.*, 2016). Destes compostos, 152 são diterpenos do tipo clerodano, considerados marcadores taxonômicos do gênero (Xia *et al.*, 2015).

Até o momento, análises fitoquímicas das folhas, caule, casca, raízes e sementes da espécie *C. sylvestris* revelaram a presença de 41 diterpenos de clerodano, que incluem 12 casearinas (A-X), 5 sylvestrisídeos (A-E), 5 caseariasídeos (A-E), 3 casearvestrinas (A-C), 1

caseargrewiina (F), 1 sylvestrina, entre outros. Além dos diterpenos do tipo clerodano, outros compostos identificados nesta espécie incluem diterpenóides não-clerodanos, sesquiterpenóides, esteróides (daucosterol e estigmastano-3 β ,6 α -diol), fenilpropanóides (6 casearialignanas A-F, entre outros) e compostos fenólicos, como ácido elágico e derivados, tirosol e rutina (Itokawa *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009, Xia *et al.*, 2015; Bueno *et al.*, 2016.)

Levando em conta os resultados anteriores do grupo de pesquisa e os dados obtidos da literatura, este trabalho teve por objetivo comparar o perfil fitoquímico de amostras de *C. sylvestris* adquiridas de diferentes procedências, analisar atividade antiproliferativa *in vitro* e correlacionar a composição química com as atividades observadas, contribuindo assim para o conhecimento do uso medicinal desta espécie.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

Comparação do perfil químico e de atividades farmacológicas *in vitro* de extratos obtidos a partir das folhas de *Casearia sylvestris* obtidas de diferentes procedências.

3.2 Específicos

Determinação do método extrativo através de 3 diferentes técnicas de extração: turbolização com Ultraturrax®, agitação mecânica e agitação magnética;

Extração das partes aéreas de *C. sylvestris* obtidas em ervanarias locais e coletadas no Campus através de turbolização em três sistemas solventes: extração direta com diclorometano, extração sucessiva com diclorometano e etanol 70%; extração direta com etanol 70%;

Determinação da quantidade de fenólicos totais dos extratos;

Análise qualitativa por CCD e HPLC/UV para comparação do perfil químico dos extratos;

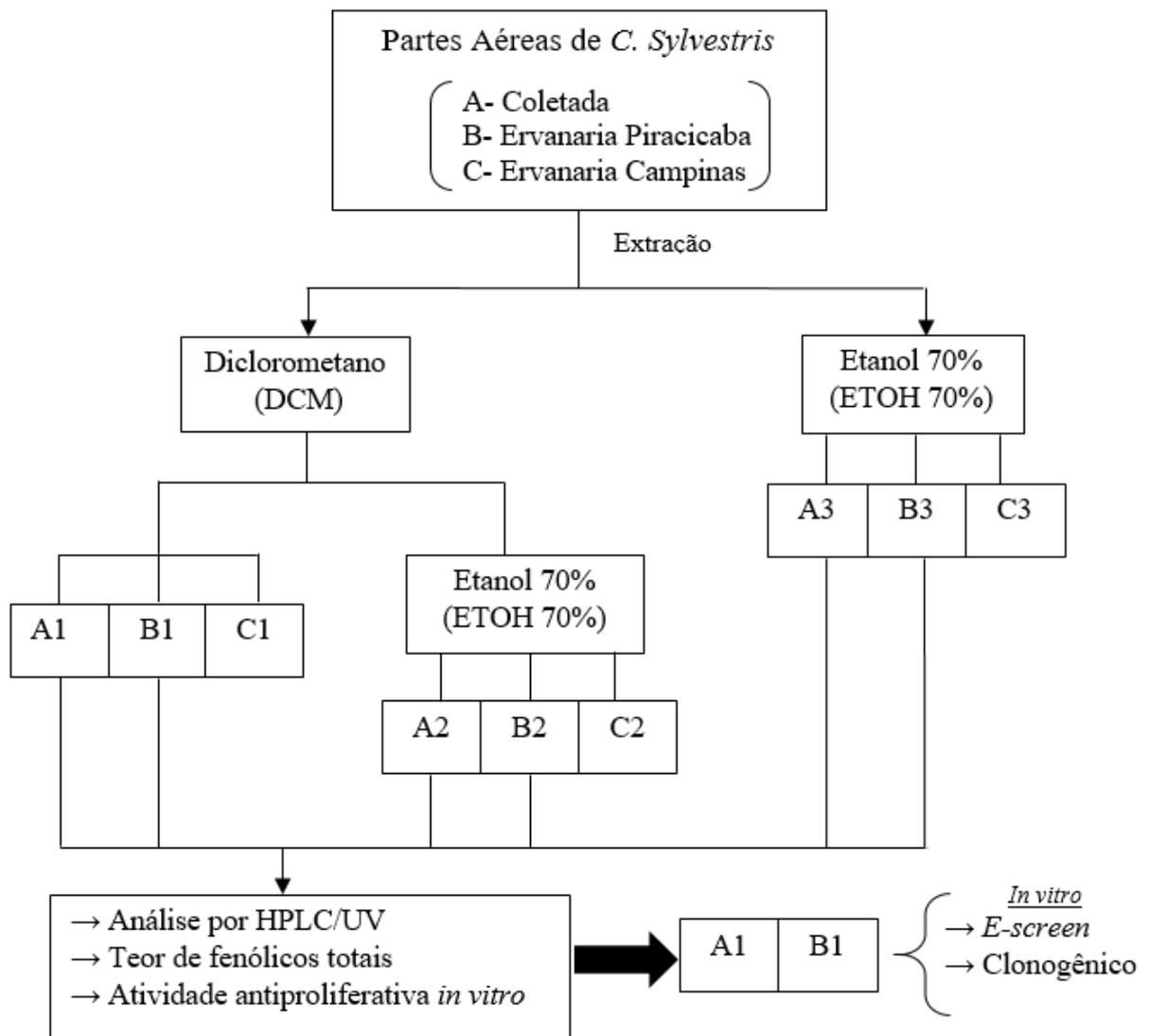
Avaliação *in vitro* dos extratos em linhagens celulares humanas, tumorais e não tumoral, de efeitos sobre proliferação celular.

Avaliação *in vitro* da ação estrogênica/antiestrogênica dos extratos com melhor desempenho na avaliação de atividade antiproliferativa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 1 apresenta o esquema geral do estudo realizado com amostras de partes aéreas de *C. sylvestris* obtidas de diferentes fontes. Cada uma das etapas será detalhada ao longo do texto.

Figura 1 - Esquema geral do estudo realizado com amostras das partes aéreas de *C. sylvestris* obtidas de fontes distintas.



Fonte: A autora

4.1 Material Vegetal

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA foi cadastrada no SisGen, conforme requisito previsto na Lei nº 13.123/2015, sob o número de cadastro AF16D29, em 22/10/2018 (Anexo 1).

A coleta das partes aéreas de *C. sylvestris* (225,0 g) foi realizada durante o período da tarde, no final do mês de maio de 2018, no *campus* da Universidade Estadual de Campinas, localizada na cidade de Campinas, estado de São Paulo. A planta estava em ambiente aberto e com direta exposição a luz solar. A identificação e a coleta foram realizadas sob supervisão da profa. Dra. Maria do Carmo do Amaral e do técnico em botânica João Carlos Galvão, ambos do Instituto de Biologia da Unicamp. Após coleta, o material vegetal foi pesado e disposto para secagem na sombra e em temperatura ambiente até peso constante. O processo de secagem foi realizado de modo a reproduzir o mesmo utilizado por populações tradicionais.

Foram ainda adquiridas duas amostras de 100,0 gramas cada, de partes aéreas de *C. sylvestris*, comercializadas em duas ervanarias, uma localizada na cidade de Piracicaba, SP e outra localizada na cidade de Campinas, SP.

4.2 Preparação dos Extratos

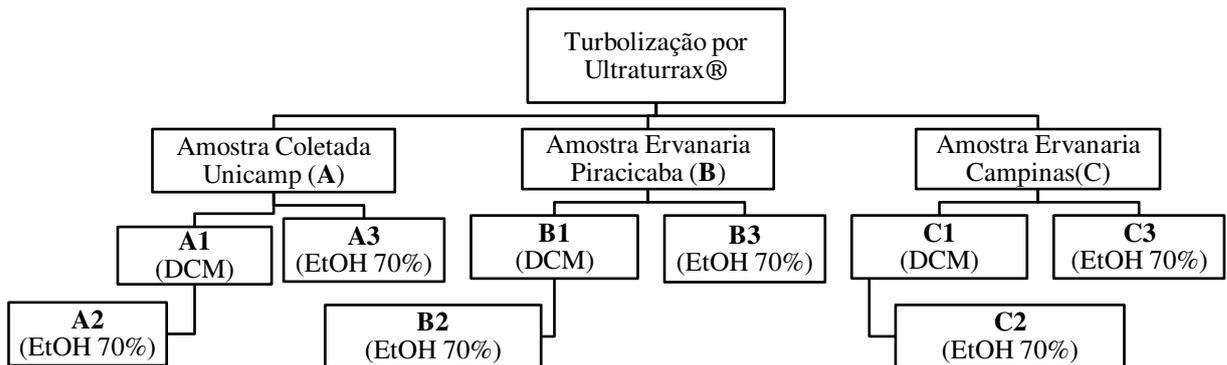
A etapa fitoquímica foi realizada no laboratório de graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP com auxílio e supervisão da Profa. Dra. Mary Ann Foglio e dos técnicos de laboratório Arthur Kael Rodrigues da Pia e Débora Zorrón Berlinck, e no Laboratório de Fitoquímica, Farmacologia e Toxicologia Experimental (LaFTEEx) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP com auxílio e supervisão da Dra. Ilza Maria de Oliveira Souza e dos técnicos em química Dayana Joicy Santana e Kaio Eduardo Buglio.

Para avaliação e determinação do melhor processo de extração por agitação em temperatura ambiente, foram testadas três técnicas: 1) turbulização por Ultraturrax (Homogeneizador T10 basic, IKA®); 2) agitação mecânica (Agitador 713, Fisatom) e 3) agitação magnética (Agitador SL-92, Solab).

Nessas circunstâncias, alíquotas (10g cada) da amostra B foram extraídas por turbulização com Ultraturrax (Nível 4 ± 16.500 RPM), agitação mecânica a (Nível 20 ± 1000 RPM) e agitação magnética (Nível 27 ± 800 RPM), com diclorometano (DCM), na proporção de 1:20 (p:v), por 15 minutos, sendo o processo repetido três vezes. Após reunião dos filtrados e análise visual dos resíduos vegetais e dos extratos fluidos obtidos, optou-se pelo método de extração por turbulização para preparação dos extratos das três amostras de *C. sylvestris*.

Assim, alíquotas (10 g cada) das folhas secas de *C. sylvestris*, provenientes de campus Unicamp (**A**), ervanaria Piracicaba (**B**) e ervanaria Campinas (**C**), foram extraídas diretamente com DCM (extratos **1**) e sucessivamente com solução hidroetanólica 70% (EtOH 70%) (extratos **2**) ou diretamente em EtOH 70% (extratos **3**) (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma do processo de extração das folhas de *Casearia sylvestris*.



Amostra: 10 g; Proporção planta:solvente = 1:20 p:v (folhas). Origem das amostras: Coletada no campus da Unicamp (**A**), obtida na ervanaria de Piracicaba, SP (**B**) e obtida na ervanaria de Campinas, SP (**C**). Método extrativo: turbulização por Ultraturrax®. Sistemas solventes: extração direta com DCM (**1**) sucessiva com EtOH 70% (**2**) e direta com EtOH 70% (**3**). Fonte: A autora.

Em todos os processos extrativos, foram realizados três ciclos de exposição do material vegetal ao sistema solvente, sempre na proporção de 1:20 (p:v). Ao fim de cada ciclo foi realizado processo de filtração em papel para separação do resíduo vegetal, os filtrados resultantes de cada ciclo foram reunidos e filtrados novamente. O solvente orgânico foi eliminado por evaporação a vácuo, na temperatura de 40 °C, em evaporador rotativo (R-200, BÜCHI), sendo os resultantes expostos a jatos de ar comprimido, com auxílio de uma bomba de aquário adaptada, para evaporação da água residual e obtenção dos extratos brutos secos (EBS).

Durante este processo, todos os três extratos da amostra obtida na ervanaria de Campinas (C1, C2 e C3) foram contaminados por fungos e por isso foram descartados. Para as análises subsequentes foram empregados os seis extratos restantes (A1, A2, A3, B1, B2 e B3), que foram pesados, alíquotados e armazenados em geladeira até o momento das análises.

4.2.1 Análise do Teor de Fenólicos Totais

Princípio do método: Compostos fenólicos são compostos que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila (Dai & Mumper, 2010). O método colorimétrico de Folin-Ciocalteu é utilizado para quantificação de compostos fenólicos. O reagente de Folin-Ciocalteu é formado pela mistura de ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngstico que podem ser reduzidos na presença de ânions fenolatos, gerados em meio alcalino pela desprotonação dos compostos fenólicos. Essa reação de redução leva à formação de complexo molibdênio-tungstênio, de coloração azul. A intensidade da coloração é proporcional à concentração de substâncias redutoras o que possibilita a determinação do teor de substâncias fenólicas totais nas amostras (Oliveira *et al.*, 2009). O teste seguiu protocolo elaborado por Singleton & Rossi (1965) com adaptações de Alves e colaboradores (2010).

Protocolo: Alíquotas das amostras em estudo (A1, A2, A3, B1, B2 e B3) foram solubilizadas em água destilada, na concentração final de 1000 µg/mL e em seguida, diluídas com água destilada até as concentrações de 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL. De modo similar, preparou-se a curva de calibração (Tabela 3) de ácido gálico (398225 – Sigma Aldrich) a partir de uma solução aquosa na concentração de 1000 µg/mL. Foram ainda preparadas, imediatamente antes do início do teste, as soluções de carbonato de sódio 7,5% (6392 – Merck) e do reagente de Folin-Ciocalteu (FC, 1:10, em água) (F9252- Sigma Aldrich).

Tabela 3 – Preparação da curva de calibração de ácido gálico para análise do teor de fenólicos totais.

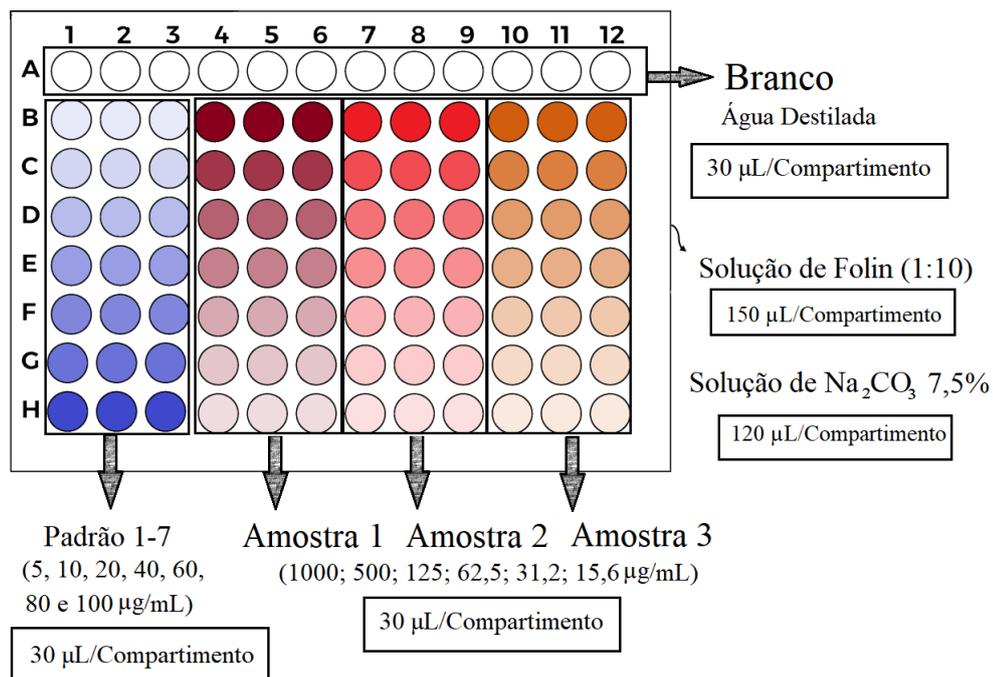
Padrões	Concentração final (µg/mL)	Ácido gálico* (µL)	Água destilada (µL)
P1	5	5	995
P2	10	10	990
P3	20	20	980
P4	40	40	960
P5	60	60	940
P6	80	80	920
P7	100	100	900

*Volumes utilizados da solução estoque a 1000 µg/mL

Em microplaca de 96 compartimentos (Figura 3), pipetou-se as diferentes concentrações das amostras e dos padrões de ácido gálico (30 µL/compartimento, em triplicata). Em todos os compartimentos da primeira linha da placa, pipetou-se água destilada (30

$\mu\text{L}/\text{compartimento}$) para preparação do branco da reação. Adicionou-se então, em todos os compartimentos, as soluções recém preparadas de FC (1:10, $150 \mu\text{L}/\text{compartimento}$) e de carbonato de sódio (Na_2CO_3 , 7,5%, $120 \mu\text{L}/\text{compartimento}$), totalizando $300 \mu\text{L}$ por compartimento.

Figura 3- Desenho experimental da placa de 96 compartimentos utilizada na análise do teor de fenólicos totais.



Padrão: Ácido gálico (5, 10, 20, 40, 60, 80 e $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, em triplicata); Amostra-teste (até 3 por placa): 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250, 500 e $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ (em triplicata); Branco: água destilada. Após aplicação do branco, das amostras, e do padrão ($30 \mu\text{L}/\text{compartimento}$), foram adicionados em todos os compartimentos as soluções de Folin-Ciocalteu (1:10, $150 \mu\text{L}/\text{compartimento}$) e de Na_2CO_3 (7,5%, $120 \mu\text{L}/\text{compartimento}$). Fonte: A autora.

As microplacas foram incubadas por 15 minutos a 45°C , e em seguida mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos, sempre sob abrigo da luz. A leitura espectrofotométrica a 765 nm foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices). O ácido gálico foi utilizado como composto fenólico de referência e os resultados das amostras foram expressos como mg equivalente de ácido gálico (EAG)/g de amostra.

4.2.2 Análise Qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Princípio do método: A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido-sólido, onde a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Essa técnica pode ser usada tanto na escala analítica quanto na preparativa sendo a sílica gel a fase estacionária mais utilizada. Uma vez que as fases estacionárias mais usadas são extremamente polares, não devem ser utilizadas fases móveis pouco polares, que não removeriam os compostos do ponto de aplicação. Fases móveis muito polares também não são indicadas uma vez que são capazes de arrastar os componentes da amostra até o topo da placa. Em vista disso, melhores resultados são obtidos com misturas de solventes, de modo a se obter uma polaridade média em relação à polaridade dos componentes da amostra (Degani, Cass & Vieira, 1998).

Protocolo: As condições de análise por CCD foram selecionadas com base em protocolos do livro “*Plant Drug Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas*” de Wagner & Bladt, 1984, com adaptações. Alíquotas (3 mg) das amostras A1, A2, A3, B2 e B3 foram diluídas em 1 mL do solvente utilizado para extração e aplicadas (10 µL cada) em cromatofolhas de alumínio contendo TLC - Sílica gel 60 F₂₅₄. Cada cromatofolha permitiu análise de todas as amostras simultaneamente.

Foram preparadas duas fases móveis distintas: 1 = acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:27) e 2 = diclorometano:metanol (99:1). Para cada fase móvel preparada foram analisadas duas cromatoplasmas contendo as amostras. As corridas ocorreram individualmente com as cubas devidamente ambientadas. Após término da corrida as cromatoplasmas foram reveladas com solução de anisaldeído ou expostas ao reagente NP/PEG e observadas a olho nu e a 254 e 365nm.

4.2.3 Análise Qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector UV/VIS (HPLC-UV)

Princípio do método: A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica cromatográfica que emprega uma fase móvel líquida enquanto a fase estacionária pode ser líquida ou sólida para separar os componentes de uma amostra. As fases estacionárias podem ser classificadas de acordo com o mecanismo pelo quais estas separam as moléculas. O detector de absorvância UV-visível é o detector de HPLC mais comum em uso, detectando compostos que absorvem na região de 190 a 600 nm (Swartz, 2010).

Protocolo: As condições de análise por HPLC foram selecionadas com base no protocolo de análise de diterpenos clerodânicos e compostos fenólicos de *C. sylvestris*, descrito

por Bueno e colaboradores (2015) com adaptações. Alíquotas (cerca de 8 mg) das amostras A1, A2, A3, B2 e B3 foram diluídas em acetonitrila:água deionizada (1:1, 5 ml). Para diluição da amostra B1 foi utilizada a mistura acetonitrila:água deionizada:metanol (3,5:1:0,5, 5 ml) para completa solubilização. Após filtração em filtro de nylon de 0,22 μm , uma alíquota de 1,0 ml de cada solução preparada foi transferida para vial para a injeção automática da amostra. As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC-2030, Shimadzu) equipado com detector UV/VIS. Foram realizadas análises em duas colunas analíticas, coluna Gemini 5 μ C18 (250 x 4,6 mm, 110 Å) e coluna Phenomenex Luna 5 μ CN (250 x 4,6 mm, 100 Å). Um padrão de quercetina (Merck) (1 mg/mL em acetonitrila:água deionizada 1:1) foi avaliado nas mesmas condições experimentais.

As condições cromatográficas utilizadas foram fluxo de 1 mL/min, temperatura do forno de 35° C e volume de injeção de 10 μL . A fase móvel consistiu em solução aquosa de ácido fórmico 0,1% de (A) e acetonitrila (B) em gradiente de eluição (10–25% de B de 0 a 15 min, 25–90% de B até 35 min, mantendo 90% de B até 55 min retornando à condição inicial em 2 min com tempo de equilíbrio de 3 min). Os cromatogramas foram adquiridos em 235 nm e 254 nm e os dados processados usando o software do equipamento.

4.3 Avaliação Farmacológica *in vitro*

As etapas farmacológicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica, Farmacologia e Toxicologia experimental (LAFTex) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNICAMP e no Laboratório de Cultura de Células do Instituto de Química, com auxílio e supervisão da Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz e da Ma. Lucia Elaine de Oliveira Braga.

4.3.1 Avaliação Farmacológica em Cultura de Células

4.3.1.1 Linhagens Celulares

A fim de evitar contaminação e garantir a viabilidade celular, os testes foram realizados sob condições assépticas em ambiente controlado de fluxo laminar biológico, utilizando materiais e reagentes esterilizados de acordo com a natureza de cada um.

As linhagens tumorais MCF-7, U251 e NCI-H460 foram cedidas pelo *Frederick Cancer Research & Development Center - National Cancer Institute*, dos Estados Unidos (NCI, EUA). As linhagens tumorais MDA-MB-231 e MCF-7/AZ foram cedidas pela USP/São Carlos enquanto que as linhagens não tumorais humanas HaCaT e MCF-10A foram cedidas pela FOP/Unicamp e pela UNIFRAN, respectivamente.

As células tumorais estavam armazenadas em criotubos, devidamente identificados, organizados em caixas de papelão acopladas a uma rack e submergidas em tambor contendo nitrogênio líquido. Para utilização nos experimentos os criotubos foram descongeladas através de descongelamento rápido e as células imediatamente inoculadas em garrafas T25 (Corning®) contendo meio completo [meio RPMI 1640 (Nutricell, Brasil) com vermelho fenol suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Brasil) e 1% de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, Vitrocell, Brasil)]. Cada linhagem foi inoculada em uma garrafa individual devidamente identificada.

Todas as linhagens foram mantidas em cultura em meio completo – suplementado com 5% de soro fetal bovino, em garrafas T25 ou T75, em incubadora com atmosfera umidificada, com 5% de CO₂, a 37 °C, realizando manutenção e troca do meio de acordo com as necessidades das células.

Em alguns momentos, quando não havia mais espaço para crescimento celular, foi necessário realizar dissociação enzimática das células aderidas através da utilização de tripsina. Cada vez que este processo foi realizado aumentou-se uma vez o número de passagem daquela garrafa. O número de passagens se refere ao número de vezes que essa cultura foi subcultivada.

Para utilização nos experimentos todas as células de todas as linhagens utilizadas se encontravam dentro da faixa de 4-12 passagens.

Tabela 4 - Linhagens celulares tumorais e não tumorais (imortalizadas) humanas utilizadas nos estudos *in vitro*

Linhagem	Órgão/Doença	D.I.[#] (x 10⁴ cel/mL)
MCF-7	Mama; adenocarcinoma	6,0
MCF-7/AZ	Mama; adenocarcinoma	4,0
MDA-MB-231	Mama; adenocarcinoma	4,0
MCF-7/10A	Mama; epitelial / Não tumoral	4,0
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	4,0
U251	SNC; glioma	4,0
HaCaT	Pele (queratinócito) / Não tumoral	4,0

D.I.= densidade de inoculação para o teste de atividade antiproliferativa.

4.3.1.2 Preparação das Amostras

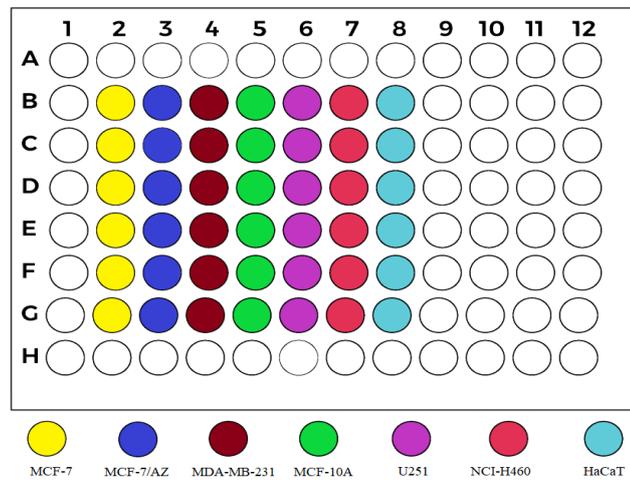
Todas as amostras foram previamente solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração de 100 mg/mL, com auxílio de vórtex (Vortex Mixer – Fischer Scientific), e em seguida submetidas a diluição seriada com meio completo para obtenção das concentrações finais empregadas em cada teste. Doxorrubicina (Eurofarma) e Tamoxifeno (Sigma Aldrich), utilizados como controles positivos de atividade antiproliferativa, foram diluídos seguindo o mesmo protocolo.

4.3.1.3 Avaliação de Atividade Antiproliferativa

A atividade antiproliferativa dos extratos foi realizada seguindo protocolo descrito por Monks e colaboradores (1991), com adaptações. As linhagens celulares utilizadas, bem como a densidade de inoculação das mesmas estão descritas na Tabela 4.

Em placas de 96 compartimentos denominadas placas T1 (tratadas), a suspensão celular foi inoculada (100 µL/compartimento, 66 compartimentos por placa), uma placa para cada linhagem celular. Uma outra placa de 96 compartimentos, denominada placa T0 (controle de células no início do experimento) (Figura 4), foi preparada com inóculos de todas as linhagens celulares (100 µL/compartimento, sextuplicata). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, por 24 horas.

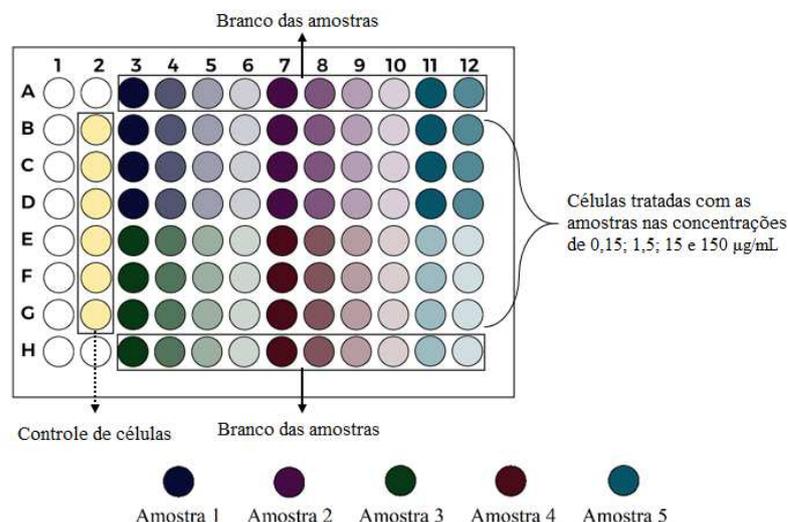
Figura 4- Desenho experimental da placa controle T0 contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.



Linhagens tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama que superexpressa receptores de estrogênio); MCF-7/AZ (adenocarcinoma mama que superexpressa receptores de estrogênio e de progesterona); MDA-MB-231 (carcinoma de mama triplo negativo) NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células) e U251 (glioma). Linhagens não tumorais humanas: MCF-10A (mama) e HaCaT (queratinócito). Fonte: A autora.

Após 24 horas de incubação, as células das placas T1 foram expostas a quatro concentrações (0,15; 1,5; 15 e 150 $\mu\text{g/mL}$) das amostras em teste. Como controle positivo de atividade antiproliferativa foram utilizados os quimioterápicos Doxorrubicina (0,015; 0,15; 1,5 e 15 $\mu\text{g/mL}$) e Tamoxifeno (0,15; 1,5; 15 e 150 $\mu\text{g/mL}$). Cada placa permitiu a análise de 5 amostras simultaneamente (Figura 5).

Figura 5 - Desenho experimental da placa de 96 compartimentos do teste de avaliação de atividade antiproliferativa *in vitro*, para cada linhagem testada.



Fonte: A autora.

A fim de determinar a quantidade de células presentes no início do experimento, logo após adição das amostras nas placas T1, a placa T0 foi fixada com ácido tricloroacético (TCA, Sigma®, 50%, 50 µL/compartimento) e mantida por 1 hora a 4 °C. Em seguida, foi lavada em água corrente quatro vezes consecutivas para remoção de resíduos de TCA, meio, soro fetal bovino e metabólitos secundários. O TCA atua como fixador precipitando proteínas, permitindo que células viáveis se mantenham fixas na placa, enquanto os resíduos se desprendem com a lavagem em água corrente (Fiorito, 2016).

As placas T1 foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ e, após esse período, foram fixadas por TCA seguindo o mesmo processo realizado com a placa T0.

Após secagem a temperatura ambiente, as células fixadas foram coradas com sulforrodamina B (SRB Sigma®) 0,4% (p/v) dissolvida em ácido acético 1% (50 µL/compartimento) e mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente. A sulforrodamina B é um corante proteico utilizado por se ligar nas aminas presentes nas proteínas celulares das células viáveis (Monks *et al.*, 1991). Após lavagem com solução de ácido acético a 1% para remoção do excesso de corante e secagem em temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (10 µM, pH 10,5, Sigma®, 150 µL/compartimento).

Os resultados foram analisados através de leitura espectrofotométrica das microplacas (em 540 nm) no leitor (Molecular Devices®, modelo VersaMax). As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos.

A proliferação celular (%) de cada linhagem testada frente às diferentes amostras foi calculada por regra de três, considerando-se os valores de absorbância das células viáveis sem tratamento ao final (T1) e no início (T0) do período de exposição e das células que foram tratadas com as amostras (C). Assim:

Se $C > T1$, a amostra estimulou o crescimento.

Se $T0 \leq C$, a amostra foi citostática: proliferação celular = $100 \times [(C-T0) / (T1-T0)]$

Se $C < T0$, a amostra foi citocida: proliferação celular = $100 \times [(C-T0) / T0]$.

Com esses valores de proliferação celular, foram construídas curvas de crescimento celular de cada linhagem em função da concentração da amostra. A partir delas foram calculadas a concentração efetiva denominada TGI (do inglês *Total Growth Inhibition*, concentração necessária para inibição total de crescimento celular) através de regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software ORIGIN 8.0 (*OriginLab Corporation*). Este

parâmetro foi utilizado para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade das mesmas.

4.3.1.3. Teste Clonogênico

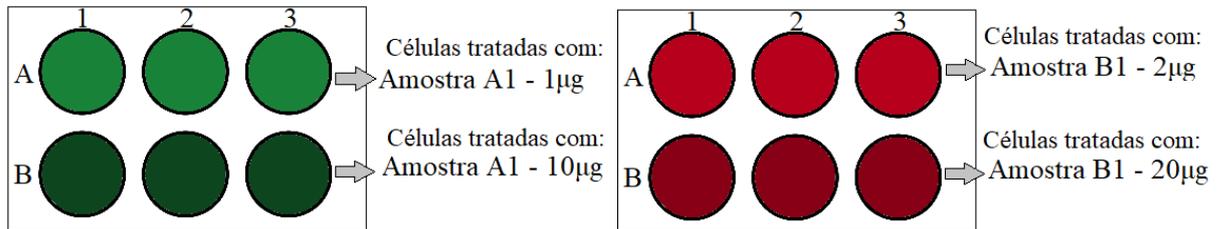
Princípio do método: O ensaio clonogênico é um método bastante confiável para a avaliação da toxicidade *in vitro*. Permite detectar células que, após tratamentos que podem causar morte reprodutiva celular, mantiveram a capacidade de produzir um grande número de progênies. Diferente de outros testes de viabilidade que mensuram um efeito biológico específico, este se baseia na capacidade de uma única célula se proliferar e dar origem a uma colônia, permitindo mensurar efeitos biológicos mais amplos (Franken *et al.*, 2006; Franchi *et al.*, 2012).

Protocolo: O teste clonogênico foi realizado com base nos protocolos descritos por Franken e colaboradores (2006) com adaptações. Com base nos resultados dos testes de atividade antiproliferativa, foram selecionadas para esta avaliação as linhagens tumorais de mama MCF-7 (d.i. $6 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) e a linhagem não tumoral de mama MCF-10A (d.i. $6 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$), cultivadas em garrafas T25 (1 garrafa/tratamento).

Quando a camada celular atingiu cerca de 80% de confluência, as células foram tratadas por 48 horas com amostras A1 e B1 de *C. sylvestris* (mais ativas no teste de atividade antiproliferativa), em duas concentrações: A1 (1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e B1 (2 e 20 $\mu\text{g/mL}$), nas próprias garrafas. Também foi preparada 1 garrafa de cada linhagem contendo células não tratadas (controle negativo).

Após o período de exposição, as células foram lavadas com tampão PBS, tripsinizadas e recolhidas em meio completo (5 mL/garrafa). A densidade celular de cada suspensão foi determinada através de contagem de células em câmara de Neubauer, com auxílio de solução de azul de tripan (Merck). Em seguida, cada suspensão celular foi ajustada para 200 células viáveis por mililitro de meio de cultura completo, sem nova adição de amostra, e plaqueada em placas de 6 compartimentos (2 mL/compartimento), em triplicata (Figura 6). Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 10 dias (pelo menos 8 ciclos celulares completos) para o desenvolvimento das colônias, com troca de meio de cultura no sétimo dia de experimento.

Figura 6- Desenho experimental do plaqueamento, em placas de 6 compartimentos, das células tratadas em garrafas T25 com duas concentrações de extratos elaborados a partir de duas amostras de folhas de *Casearia sylvestris* de diferentes procedências.



Amostras: A1 = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B1 = folhas adquiridas em ervanaria em Piracicaba, SP. Extratos obtidos a partir de turbulização com diclorometano. Fonte: A autora.

Por fim, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os compartimentos foram lavados, uma única vez, com solução de tampão fosfato em salina de Dulbecco (D-PBS, 2 mL/compartimento). As colônias foram então fixadas com Metanol:D-PBS (1:1, v/v, 2 mL/compartimento) por 2 minutos, as soluções foram desprezadas e em seguida as colônias foram fixadas com Metanol 100% (2 mL/compartimento) por 10 minutos, ao final dos quais a solução foi desprezada. Após secagem completa à temperatura ambiente, as colônias foram coradas com solução de cristal violeta (Merck Millipore, Brasil; 0,1% em água destilada, 2 mL/compartimento) durante 10 minutos, seguida de três etapas de lavagem em água de torneira (2 mL/compartimento), 3 etapas de lavagem com água destilada (2 mL/compartimento) e secagem completa à temperatura ambiente.

Com auxílio de microscópio óptico invertido, foi determinado o número de colônias por tratamento. Foi considerada como 1 colônia os aglomerados celulares com pelo menos 50 células cada. Com esses resultados foram calculadas a eficiência de plaqueamento (EP, Equação 1) e a fração de colônias que sobreviveram (FS, Equação 2) após o tratamento com a F2 conforme descrito por Franken *et al.* (2006).

$$EP (\%) = [(n^\circ \text{ colônias no controle} / n^\circ \text{ células semeadas por poço}) / n^\circ \text{ de replicatas} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

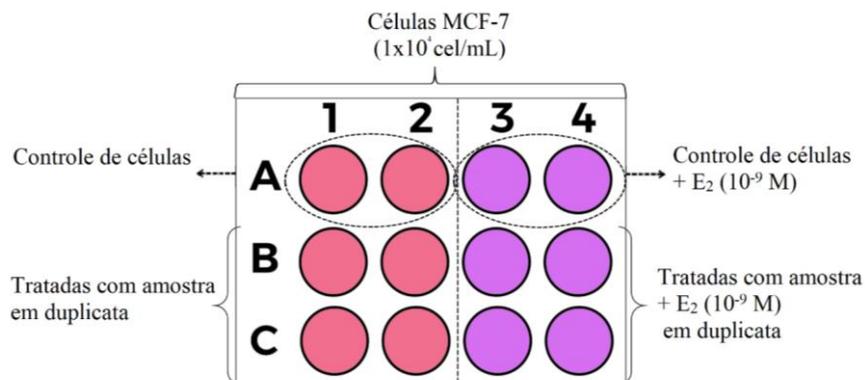
$$FS (\%) = [(n^\circ \text{ colônias no tratamento} / n^\circ \text{ células semeadas por poço}) / (n^\circ \text{ de replicatas} \times EP) \times 100 \text{ (Eq. 2).$$

4.3.1.5 Avaliação de Atividade (Anti)Estrogênica - Modelo *E-screen*

Princípio do método: O modelo *E-screen* avalia a capacidade de substâncias de mimetizar a ação proliferativa do estrogênio, através de comparação da proliferação de células MCF-7 (adenocarcinoma mamário que expressa ER) na ausência (controle negativo) e na presença (controle positivo) de 17 beta-estradiol (Soto *et al.*, 1995).

Protocolo: O ensaio foi realizado com base no protocolo de Soto e colaboradores (1995) com adaptações de Fiorito (2016). Células MCF-7 (d.i. 1×10^4 cel/mL) foram dispostas em placas de 12 compartimentos com meio RPMI 1640 completo. Após 24 horas de incubação, a 37°C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂, o meio foi cuidadosamente aspirado e substituído por meio RPMI 1640 sem vermelho fenol, acrescido de 5% de SFB tratado com Dextran e carvão ativo (GIBCO BRL) e 1% de penicilina/estreptomicina). As placas foram incubadas por 72 horas, ao final dos quais as células foram tratadas (2 mL/compartimento) com as amostras A1 (1 e 10 µg/mL) e B1 (2 e 20 µg/mL), na presença e ausência de 17β-Estradiol (E₂, 10⁻⁹ M) (Figura 7).

Figura 7- Desenho experimental da placa de 12 compartimentos do teste de avaliação de atividade (anti)estrogênica – Modelo *E-screen*.



Fonte: A autora

Tamoxifeno (15 µg/mL) foi utilizado como controle positivo de ação anti-estrogênica. As células não tratadas foram consideradas como o controle negativo. Após incubação em estufa a 37°C por 144 horas, as células foram avaliadas pelo método da sulforrodamina B conforme descrito no item 4.3.2.3.

4.4 Análises Estatísticas

Os testes *in vitro* foram expressos como média \pm desvio padrão, com nível de confiança de 95%, para detectar as diferenças entre os grupos. Os grupos experimentais de todos os testes *in vitro* foram avaliados estatisticamente por meio de análise de variância univariada – ANOVA, seguido do teste de Bonferroni, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

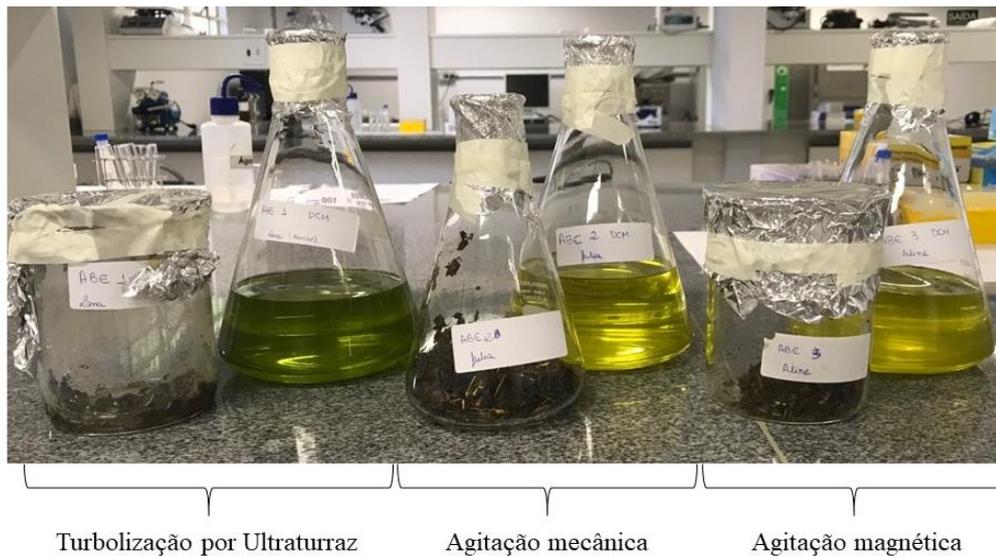
5.1 Estudo Fitoquímico

As partes aéreas coletadas no campus apresentavam como aspecto folhas pequenas/médias, coriáceas, de coloração variante entre tons claros e escuros de verde. Após a secagem à sombra do material coletado (225,0 g, peso fresco), obteve-se 114,0 g de partes aéreas secas.

As amostras adquiridas em ervanarias já estavam secas. A amostra proveniente da ervanaria de Campinas apresentava folhas verde escuro amarronzadas, íntegras, de tamanho médio, com presença de algumas fibras e alguns galhos, enquanto o material obtido da ervanaria de Piracicaba apresentava folhas de mesma coloração, porém maiores, levemente fragmentadas e com grande quantidade de galhos e fibras. Os rótulos de ambas as amostras comercializadas continham as informações sobre nome popular (guaçatonga), quantidade (100 g) e data de validade de 1 ano após embalado (ambas estavam dentro do prazo de validade).

Quanto ao método de extração, foram avaliados o aspecto do resíduo vegetal após o processo e a coloração do extrato fluido obtido (Figura 8). Com base nesse resultado, optou-se pelo método de turbolização com Ultraturrax® para a comparação das três amostras de partes aéreas de *C. sylvestris*.

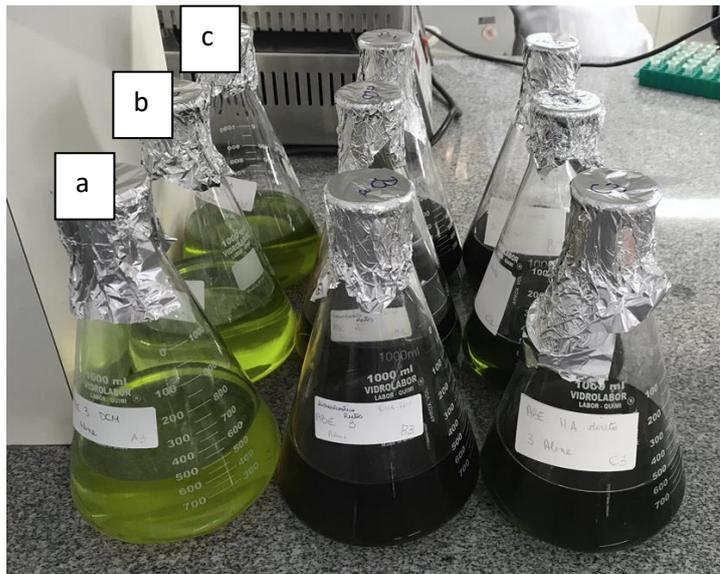
Figura 8 – Coloração do extrato e aspecto do resíduo vegetal das folhas de *C. sylvestris* obtidos pelos diferentes métodos de extração avaliados.



Fonte: A autora.

Desta forma, a partir de cada uma das amostras de partes aéreas de *C. sylvestris* (A- Coletada no campus; B- Ervanaria de Piracicaba e C- Ervanaria de Campinas) foram preparados três extratos (1- direto DCM; 2- sucessivo em EtOH 70% e 3- direto em EtOH 70%). Visualmente, os extratos diclorometânicos (DCM) de todas as amostras *C. sylvestris* apresentaram coloração verde clara, enquanto os extratos provenientes da extração sucessiva com EtOH 70% apresentaram coloração verde escura. Já os extratos obtidos através de extração de direta com EtOH 70% apresentaram coloração verde escuro/amarronzada (Figura 9). Foram calculados os rendimentos, em base seca, dos extratos das amostras A e B; não foi possível calcular o rendimento dos extratos da amostra C uma vez que todos os três apresentaram intensa contaminação por fungos durante a etapa final de evaporação (Tabela 5).

Figura 9- Extratos obtidos pelo método de turbulização com Ultraturrax® com extração sucessiva com DCM (esquerda) seguida de EtOH 70% (centro) ou diretamente em EtOH 70% (direita) de folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências, antes da evaporação dos solventes.



a) folhas de *C. sylvestris* adquiridas em ervanaria na cidade de Campinas; b) folhas de *C. sylvestris* adquiridas em ervanaria na cidade de Piracicaba; c) folhas de *C. sylvestris* coletadas no campus Barão Geraldo da Unicamp.

Fonte: A autora.

Tabela 5 – Rendimento dos processos de extração de folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências.

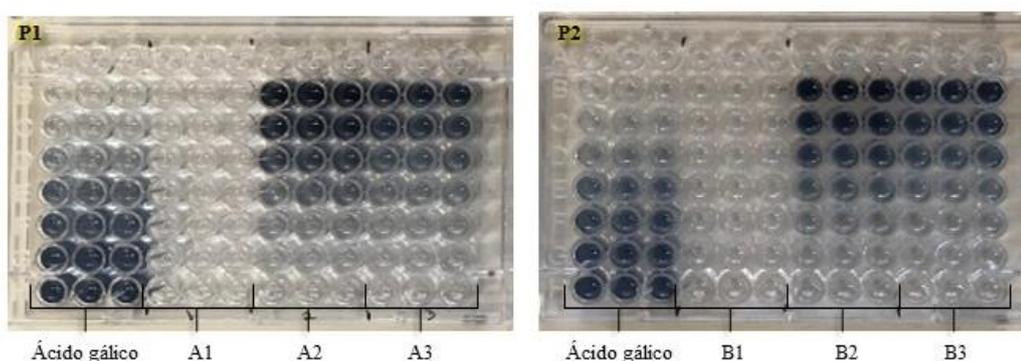
Procedência	Sistema solvente	Massa de extrato (g)	Rendimento (%)
A1	DCM	1,5579	15,5
A2	Seq. EtOH 70%	1,3947	13,9
A3	EtOH 70%	2,2857	22,2
B1	DCM	0,4608	4,6
B2	Seq. EtOH 70%	1,0727	10,7
B3	EtOH 70%	2,0454	20,4

Procedência: A = coletada no campus Unicamp/Barão Geraldo; B = ervanaria de Piracicaba, SP. Sistema solvente: DCM = extração direta em diclorometano; Seq. EtOH 70%: extração sucessiva em etanol 70%; ETOH 70%: extração direta em etanol 70%.

5.1.1 Teor de Fenólicos totais

Foram avaliados, em triplicata, os seis extratos obtidos quanto ao teor de fenólicos totais. Não foram detectados compostos fenólicos nos extratos diclorometânicos. Os extratos etanólicos, sucessiva e total, apresentaram teores similares entre si, exceto o extrato etanólico total obtido das folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo, que apresentou teor significativamente menor (Tabela 6, Figura 10, Figura 11).

Figura 10 - Aspecto da reação de Folin-Ciocalteu para quantificação do teor de fenólicos totais nos extratos das folhas de *Casearia sylvestris* de diferentes procedências.



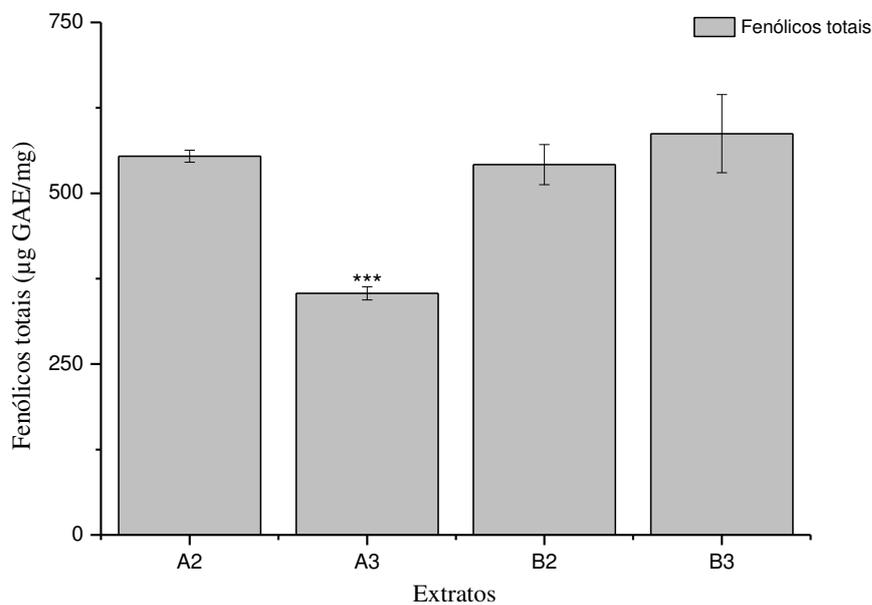
P1: Extratos obtidos a partir das folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo (A); P2: Extratos obtidos a partir das folhas adquiridas em ervanaria em Piracicaba, SP (B). Extratos obtidos a partir de turbulização direta com diclorometano (1), sucessiva com EtOH 70% (2) ou a partir de turbulização direta com EtOH 70% (3). Fonte: A autora.

Tabela 6 – Teor de fenólicos totais ($\mu\text{g GAE/mg}$) nos diferentes extratos obtidos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências.

Amostra	Análise 1	Análise 2	Análise 3	Média	Desvio padrão	CV (%)
A1	N.D.	N.D.	N.D.	-	-	-
A2^a	559,1441	543,89167	559,12551	554,05	8,80	1,59
A3^a	347,3604	348,29167	364,49393	353,38***	9,63	2,73
B1	N.D.	N.D.	N.D.	-	-	-
B2^b	544,2424	511,4902	569,97059	541,90	29,31	5,41
B3^b	597,8182	525,60784	638,16667	587,20	57,03	9,71

a) Para o cálculo de equivalência em ácido gálico selecionou-se a concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ (Amostras A2 e A3); b) Para o cálculo de equivalência em ácido gálico selecionou-se a concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (Amostras B2 e B3); N.D.: Não foram detectados compostos fenólicos (Amostras A1 e B1). Análise estatística por ANOVA seguido de teste de Bonferroni (***) $p < 0,001$.

Figura 11 – Teor de fenólicos totais ($\mu\text{g GAE/mg}$) dos extratos etanólicos, sucessiva e total, das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências.



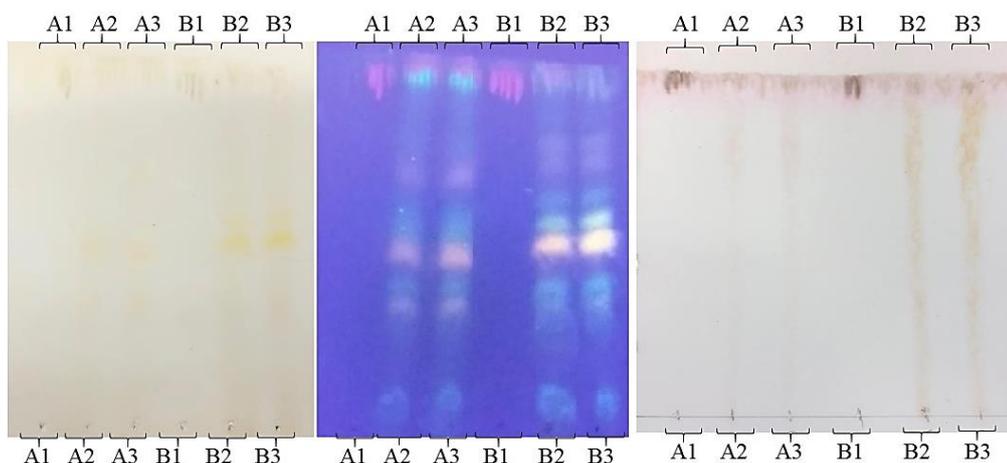
Amostras: A = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B = folhas adquiridas em ervanaria em Piracicaba, SP. 2 = Extrato obtido a partir de turbulização sucessiva com EtOH 70%; 3 = Extrato obtido a partir de turbulização direta com EtOH 70%. Análise estatística por ANOVA seguido de teste de Bonferroni (***) $p < 0,001$

5.1.2 Análise Qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os seis extratos obtidos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências foram analisados por cromatografia de camada delgada, em fases móveis de diferentes polaridades, na ausência e presença de luz UV (254 e 365 nm), antes e depois de exposição a reagente NP/PEG e de revelação com anisaldeído.

A corrida utilizando fase móvel de média/alta polaridade não permitiu que fossem observadas manchas sob fundo verde na visualização a 254 nm, sem e com NP/PEG. Já na visualização a 365 nm após exposição a NP/PEG (Figura 12), foi possível evidenciar compostos com características de sistemas de ligações duplas conjugadas nos extratos etanólicos, tanto na extração sucessiva quanto na direta com EtOH 70%. As manchas vermelhas próximas à frente da fase móvel correspondem provavelmente à clorofila. Não foram evidenciados compostos com duplas ligações conjugadas em ambos extratos diclorometânicos. Após revelação com solução de anisaldeído em meio ácido foi possível observar manchas semelhantes, em tons de marrom, nos extratos etanólico das duas amostras, estando estas mais intensas nas amostras da erva nativa de Piracicaba, SP. (B).

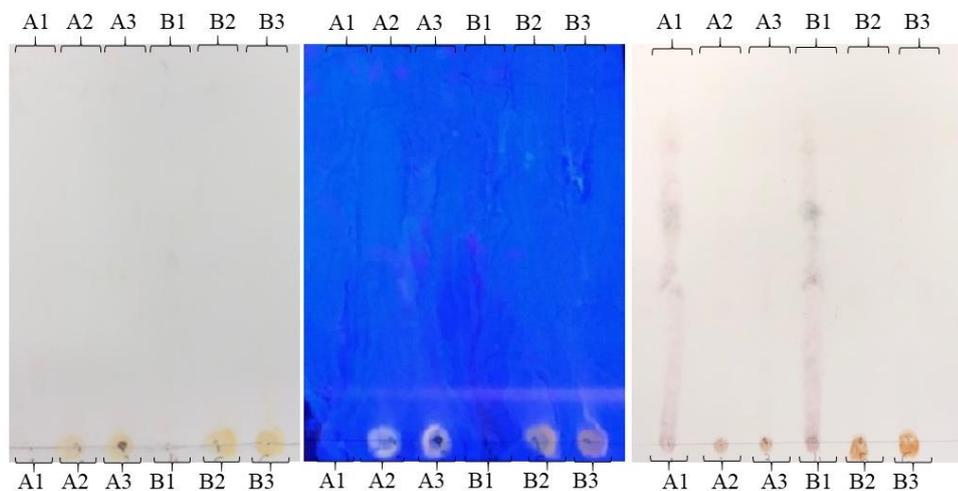
Figura 12- Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências utilizando fase móvel de média/alta polaridade.



À esquerda = observada a olho nú, após exposição ao reagente NP/PEG; ao centro = observada em 365 nm após exposição ao reagente NP/PEG; à direita: observada em após revelação com anisaldeído. Fase estacionária: TLC - Silica gel 60 F₂₅₄; Fase móvel: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:27). Amostras: A = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B = folhas adquiridas em erva nativa em Piracicaba, SP.). Extratos obtidos a partir de turbolização direta com diclorometano (1), sucessiva com EtOH 70% (2) ou a partir de turbolização direta com EtOH 70% (3). Fonte: A autora.

A corrida utilizando fase móvel de média/baixa polaridade também não evidenciou manchas sob fundo verde na visualização a 254 nm, sem e com NP/PEG. Já na visualização a 365 nm, após exposição a NP/PEG (Figura 13), foi possível evidenciar compostos com características de sistemas de ligações duplas conjugadas nos pontos de aplicação dos extratos etanólicos, tanto na extração sucessiva quanto na direta com EtOH 70%. Após revelação com solução de anisaldeído em meio ácido, foi possível observar manchas em tons de marrom semelhantes nos extratos diclorometânico das duas amostras.

Figura 13- Análise por cromatografia em camada delgada dos extratos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências utilizando fase móvel de média/baixa polaridade.

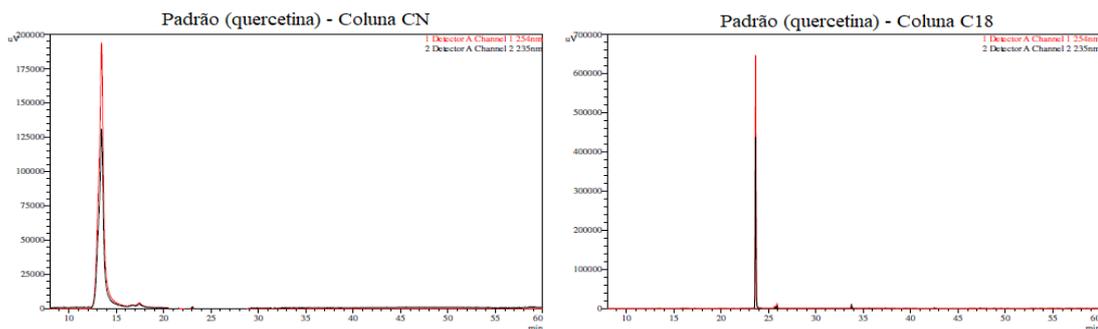


À esquerda = observada a olho nu, após exposição ao reagente NP/PEG; ao centro = observada em luz UV 365 nm após exposição ao reagente NP/PEG; à direita: observada em após revelação com anisaldeído. Fase estacionária: TLC - Sílica gel 60 F₂₅₄; Fase móvel: diclorometano:metanol (99:1). Amostras: A = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B = folhas adquiridas em ervaçaria em Piracicaba, SP.). Extratos obtidos a partir de turbolização direta com diclorometano (1), sucessiva com EtOH 70% (2) ou a partir de turbolização direta com EtOH 70% (3). Fonte: A autora.

5.1.3 Análise Qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector UV/VIS (HPLC-UV)

Os seis extratos obtidos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências e o flavonoide quercetina foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em duas fases estacionárias diferentes, com os cromatogramas registrados a 235 e 254 nm (Figuras 14, 15 e 16). Na fase estacionária CN, o pico referente à quercetina apresentou mais alargado e com tempo de retenção (t_R) em torno de 13 min, enquanto no cromatograma obtido com a fase estacionária C18, o pico apresentou-se mais fino (melhor resolução) e com t_R em torno de 24 min. Em ambas as análises, o sinal foi mais intenso quando o cromatograma foi registrado em 254 nm.

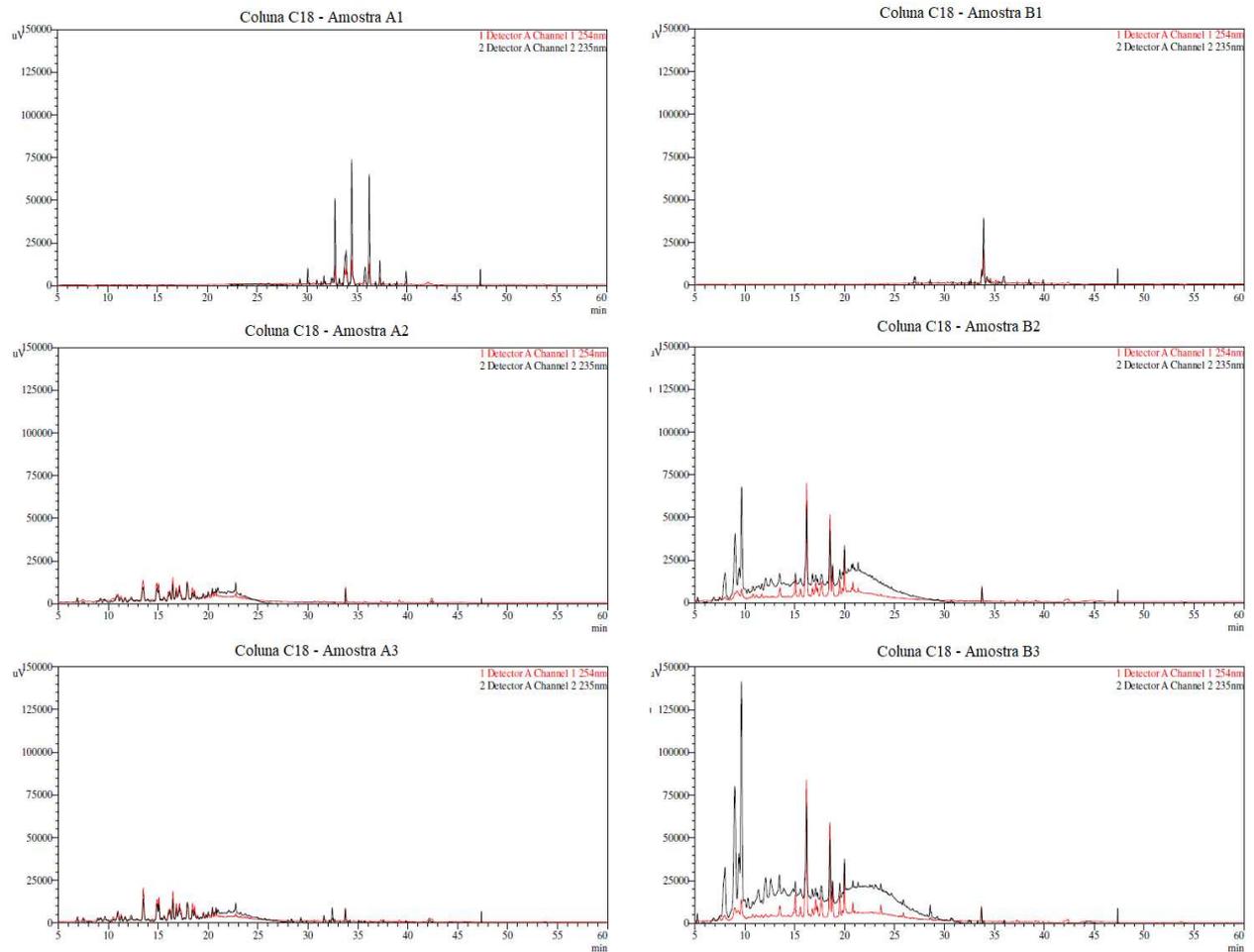
Figura 14- Cromatogramas de quercetina (padrão de flavonoide) obtido por HPLC/UV-VIS e registrado em 254 nm (representada pela cor vermelha) e 235 nm (representada pela cor preta).



Fase estacionária: Coluna CN (esquerda) e Coluna C18 (direita). Fase móvel: água deionizada acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) em gradiente de eluição (10–25% de B de 0 a 15 min, 25–90% de B até 35 min, mantendo 90% de B até 55 min retornando à condição inicial em 2 min com tempo de equilíbrio de 3 min). Vazão do fluxo: 1 mL/min; Temperatura do forno: 35° C; Volume de injeção: 10 µL; Concentração da amostra: 1 mg/mL. Eixo X (vertical) = densidade ótica; Eixo Y (horizontal) = tempo (min). Fonte: A autora.

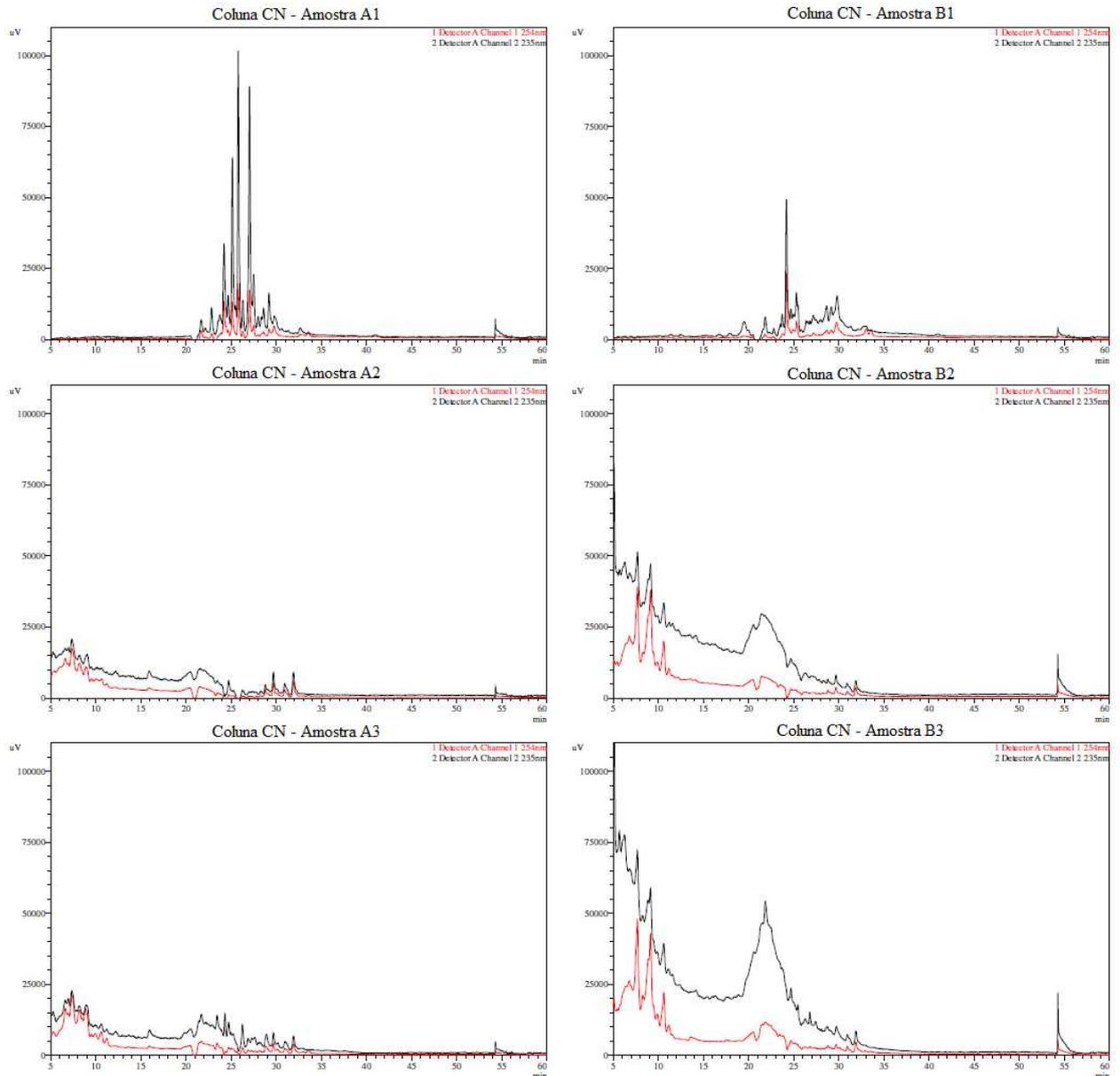
Na ausência de padrões específicos, levando em conta o padrão de quercetina utilizado e os dados disponibilizados em estudos de Bueno e colaboradores (2015), observou-se que os compostos fenólicos apresentaram um tempo de retenção menor do que os terpenos na coluna C18. Foi possível evidenciar que os extratos preparados com a amostra A (coletada) aparentam ter maior quantidade de terpenos e menor quantidade de compostos fenólicos do que os preparados com a amostra B (ervanaria de Piracicaba) (Figura 15). Já na análise com fase estacionária CN, além dos fenólicos apresentarem um tempo de retenção menor, os sinais também apresentaram menor resolução do que aquela observada para os sinais referentes aos terpenos (Figura 16).

Figura 15- Cromatogramas, obtidos por HPLC/UV-VIS, dos seis extratos obtidos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências, em coluna C18 e registrados em 254 nm (representada pela cor vermelha) e 235 nm (representada pela cor preta).



Amostras: A = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B = folhas adquiridas em ervanaria em Piracicaba, SP. Extratos obtidos a partir de turbulização direta com diclorometano (1), sucessiva com EtOH 70% (2) ou a partir de turbulização direta com EtOH 70% (3). Fase estacionária: Coluna C18. Fase móvel: água deionizada acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) em gradiente de eluição (10–25% de B de 0 a 15 min, 25–90% de B até 35 min, mantendo 90% de B até 55 min retornando à condição inicial em 2 min com tempo de equilíbrio de 3 min). Vazão do fluxo: 1 mL/min; Temperatura do forno: 35° C; Volume de injeção: 10 µL; Concentração das amostras: A1 = 1,7 mg/mL, A2 = 1,4 mg/mL, A3 = 1,7 mg/mL, B1 = 1,8 mg/mL, B2 = 2,1 mg/mL, B3 = 2,1 mg/mL. Eixo X (vertical) = densidade ótica; Eixo Y (horizontal) = tempo (min). Fonte: A autora.

Figura 16 - Cromatogramas, obtidos por HPLC/UV-VIS, dos seis extratos obtidos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências, em coluna CN e registrados em 254 nm (representada pela cor vermelha) e 235 nm (representada pela cor preta).



Amostras: A = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B = folhas adquiridas em ervanaria em Piracicaba, SP. Extratos obtidos a partir de turbulização direta com diclorometano (1), sucessiva com EtOH 70% (2) ou a partir de turbulização direta com EtOH 70% (3). Fase estacionária: Coluna CN. Fase móvel: água deionizada acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) em gradiente de eluição (10–25% de B de 0 a 15 min, 25–90% de B até 35 min, mantendo 90% de B até 55 min retornando à condição inicial em 2 min com tempo de equilíbrio de 3 min). Vazão do fluxo: 1 mL/min; Temperatura do forno: 35° C; Volume de injeção: 10 µL; Concentração das amostras: A1 = 1,7 mg/mL, A2 = 1,4 mg/mL, A3 = 1,7 mg/mL, B1 = 1,8 mg/mL, B2 = 2,1 mg/mL, B3 = 2,1 mg/mL. Eixo X (vertical) = densidade óptica; Eixo Y (horizontal) = tempo (min). Fonte: A autora

5.2 Estudo Farmacológico *in vitro*

5.2.1 Atividade Antiproliferativa em Pannel de Células Tumorais

As amostras foram avaliadas em painel de células humanas (5 tumorais e 2 não-tumorais) em concentrações de 0,15 a 150 µg/mL, com período de exposição de 48h (Figuras 17 e 18). Como controle positivo de atividade antiproliferativa foram utilizados os quimioterápicos Doxorrubicina (nas concentrações de 0,015; 0,15; 1,5 e 15 µg/mL) e Tamoxifeno (nas concentrações de 0,15; 1,5; 15 e 150 µg/mL) (Figura 19). A atividade antiproliferativa foi expressa como a concentração necessária, em µg/mL, para inibir totalmente a proliferação celular (TGI, Tabela 7).

Tabela 7 - Atividade antiproliferativa, expressa como concentração necessária para inibir totalmente a proliferação celular (TGI, µg/mL), extratos obtidos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências.

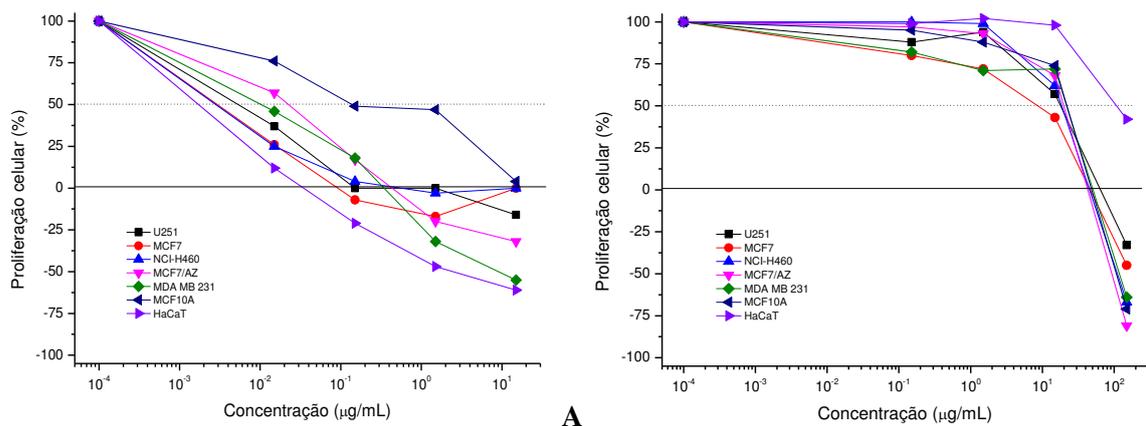
Amostra	MCF7	MCF7/AZ	MDA-MB-231	NCI-H460	U251	HaCaT	MCF10A
A1	12,7 (M)	14,1 (M)	5,2 (P)	36,1 (F)	14,5 (M)	6,8 (M)	11,2 (M)
A2	>150 (I)	>150 (I)	>150 (I)	>150 (I)	146,0 (I)	>150 (I)	>150 (I)
A3	49,5 (F)	65,0 (I)	41,1 (F)	>150 (I)	32,7 (F)	49,1 (F)	57,1 (I)
B1	33,1 (F)	26,9 (F)	36,2 (F)	62,7 (I)	24,8 (F)	17,1 (F)	26,4 (F)
B2	75,7 (I)	>150 (I)	>150 (I)	>150 (I)	109,7 (I)	>150 (I)	>150 (I)
B3	78,3 (I)	72,6 (I)	117,9 (I)	>150 (I)	72,2 (I)	92,6 (I)	103,9 (I)
Doxorrubicina	0,52	0,69	0,31	2,9	1,0	0,033	> 15
Tamoxifeno	42,4	39,7	51,3	44,5	67,6	>150	49,0

TGI: *Total Growth Inhibition*, concentração média necessária para inibir totalmente a proliferação celular; Amostras: A = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B = folhas adquiridas em ervanaria em Piracicaba, SP. Extratos obtidos a partir de turbolização direta com diclorometano (1), sucessiva com EtOH 70% (2) ou a partir de turbolização direta com EtOH 70% (3). Linhagens tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama que superexpressa receptores de estrogênio); MCF-7/AZ (adenocarcinoma mama que superexpressa receptores de estrogênio e de progesterona); MDA-MB-231 (carcinoma de mama triplo negativo) NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células) e U251 (glioma). Linhagens não tumorais humanas: MCF-10A (mama) e HaCaT (queratinócito). Classificação da atividade antiproliferativa para os extratos: inativa (I; TGI > 50 µg/mL), fraca (F; 15 µg/mL <TGI <50 µg/mL), moderada (M; 6,25 µg/mL <TGI <15 µg/mL) e potente (P; TGI <6,25 µg/mL) (Fouche *et al.*, 2008).

Para classificação da atividade antiproliferativa dos extratos foi utilizado critério descrito por Fouche e colaboradores (2008), segundo o qual os resultados de TGI classificam as amostras em quatro categorias: inativas ($TGI > 50 \mu\text{g/mL}$), atividade fraca ($15 \mu\text{g/mL} < TGI < 50 \mu\text{g/mL}$), atividade moderada ($6,25 \mu\text{g/mL} < TGI < 15 \mu\text{g/mL}$) e atividade potente ($TGI < 6,25 \mu\text{g/mL}$).

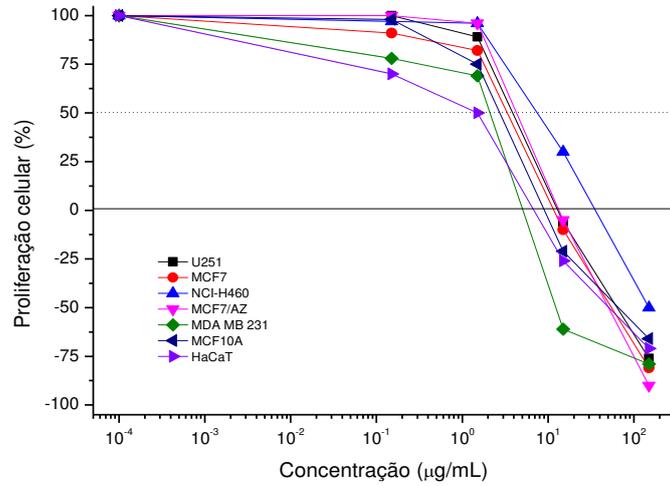
Segundo estes critérios, os extratos A2, B2 e B3 foram inativos para todas as linhagens testadas, enquanto os extratos A3 e B1 demonstraram uma fraca inibição da proliferação de algumas linhagens celulares. A amostra que apresentou a atividade antiproliferativa mais promissora foi o extrato A1, que inibiu de maneira potente a proliferação das células de mama da linhagem MDA-MB-231 e de maneira moderada todas as demais linhagens testadas.

Figura 17 - Atividade antiproliferativa dos quimioterápicos Doxorrubicina e Tamoxifeno (controle positivo) após 48 h de exposição.

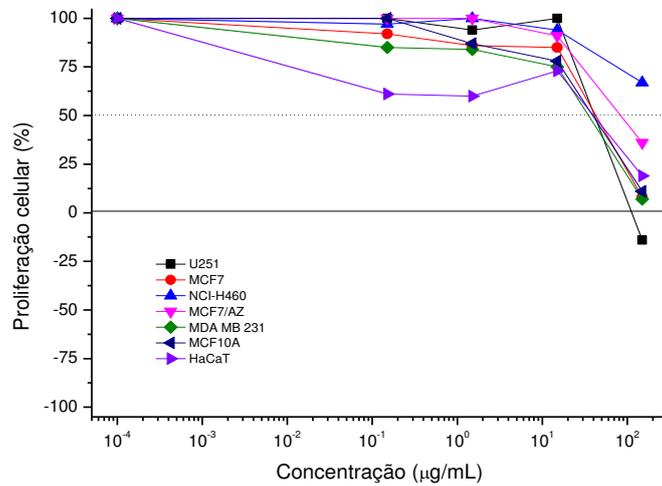


A) Doxorrubicina, Concentrações testadas: 0,015 a 15 $\mu\text{g/mL}$; B) Tamoxifeno, Concentrações testadas: 0,15 a 150 $\mu\text{g/mL}$. Linhagens tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama que superexpressa receptores de estrogênio); MCF-7/AZ (adenocarcinoma mama que superexpressa receptores de estrogênio e de progesterona); MDA-MB-231 (carcinoma de mama triplo negativo) NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células) e U251 (glioma). Linhagens não tumorais humanas: MCF-10A (mama) e HaCaT (queratinócito).

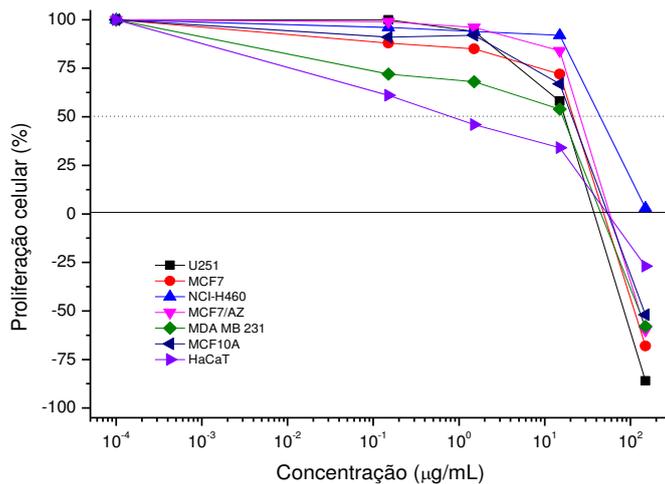
Figura 18- Atividade antiproliferativa das amostras A1, A2 e A3 obtidas das partes aéreas de *C. sylvestris* coletada no campus da UNICAMP, Campinas, SP, após 48 h de exposição.



A1



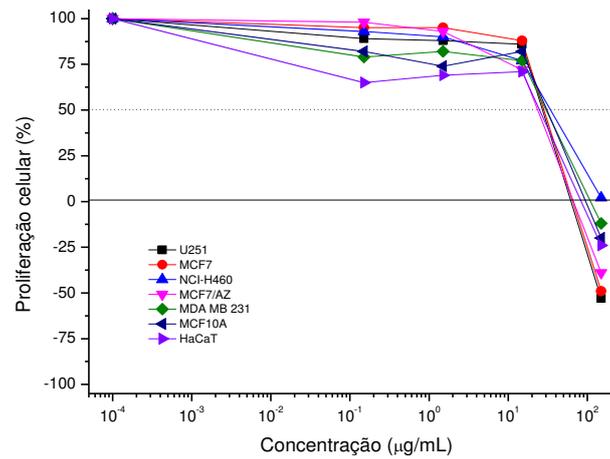
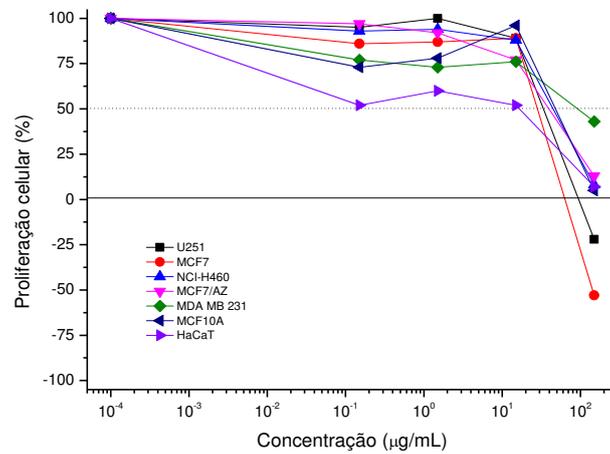
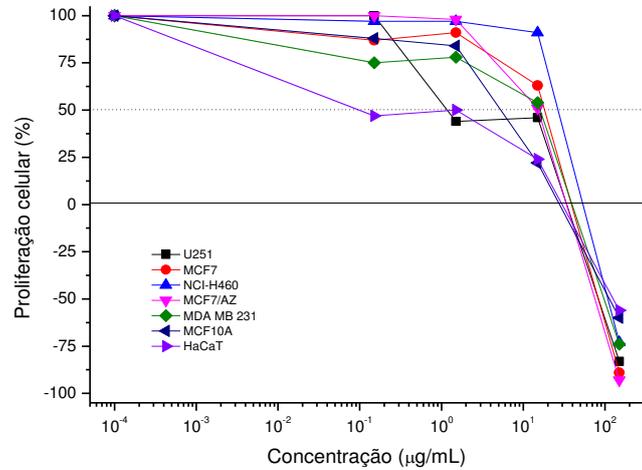
A2



A3

Extratos obtidos a partir de turbulização direta com diclorometano (A1), sucessiva com EtOH 70% (A2) ou a partir de turbulização direta com EtOH 70% (A3). Concentrações testadas: 0,15 a 150 µg/mL. Linhagens tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama que superexpressa receptores de estrógeno); MCF-7/AZ (adenocarcinoma mama que superexpressa receptores de estrógeno e de progesterona); MDA-MB-231 (carcinoma de mama triplo negativo) NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células) e U251 (glioma). Linhagens não tumorais humanas: MCF-10A (mama) e HaCaT (queratinócito).

Figura 19 - Atividade antiproliferativa das amostras B1, B2 e B3 obtidas das partes aéreas de *C. sylvestris* adquirida em ervanaria da cidade de Piracicaba, SP, após 48 h de exposição.

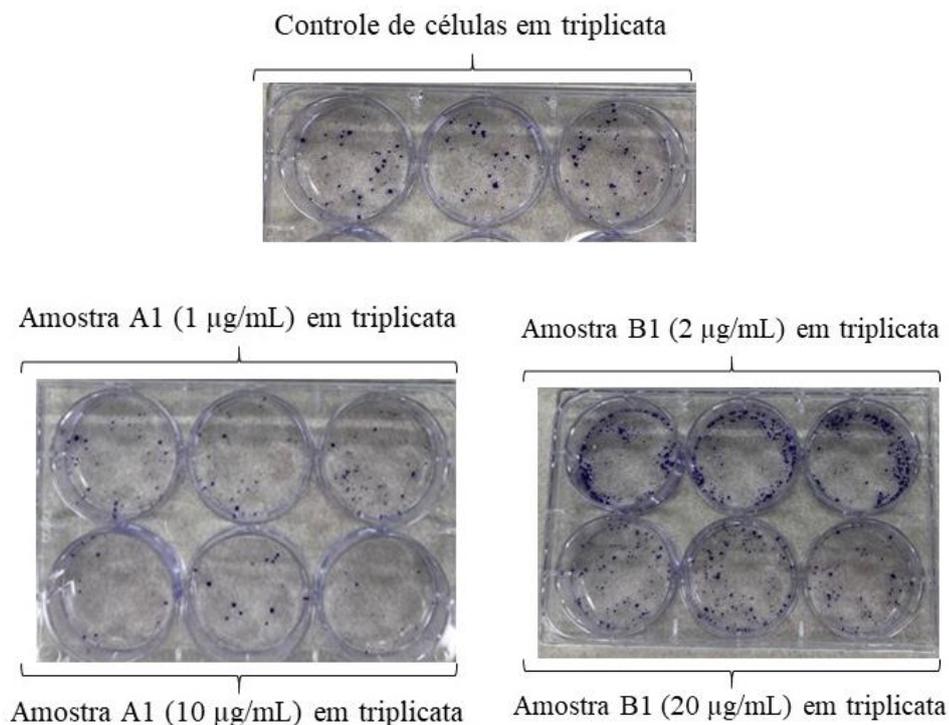


Extratos obtidos a partir de turbulização direta com diclorometano (B1), sucessiva com EtOH 70% (B2) ou a partir de turbulização direta com EtOH 70% (B3). Concentrações testadas: 0,15 a 150 µg/mL. Linhagens tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama que superexpressa receptores de estrógeno); MCF-7/AZ (adenocarcinoma mama que superexpressa receptores de estrógeno e de progesterona); MDA-MB-231 (carcinoma de mama triplo negativo) NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células) e U251 (glioma). Linhagens não tumorais humanas: MCF-10A (mama) e HaCaT (queratinócito).

5.2.2 Teste Clonogênico

A amostra A1, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, foi capaz de gerar dano permanente às células tratadas, reduzindo de maneira significativa o número de colônias formadas. A menor concentração dessa amostra (1 $\mu\text{g/mL}$) resultou em pequena redução do número de colônias formadas, porém essa redução não foi estatisticamente significativa. A amostra B2, na maior concentração (20 $\mu\text{g/mL}$) induziu um pequeno aumento no número de colônias, não sendo estatisticamente significativo. Entretanto a mesma amostra em menor concentração (2 $\mu\text{g/mL}$) provocou um aumento significativo no número de colônias formadas após exposição ao tratamento. Estes dados podem ser visualizados na Figura 20 e na Tabela 8.

Figura 20- Formação de colônias de células MCF7 incubadas por 10 dias após 48 h de exposição aos extratos diclorometano obtidos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências.



Extratos obtidos a partir de turbolização direta com diclorometano: A1 = no campus da UNICAMP, Campinas, SP; B1 = adquirida em ervanaria da cidade de Piracicaba, SP. Fonte: A autora.

Tabela 8 – Número de colônias formadas, eficiência de plaqueamento (E.P.) e fração sobrevivente (F.S.) de células MCF7 incubadas por 10 dias após 48 h de exposição aos extratos diclorometano obtidos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências.

Tratamento		MCF-7		
		Nº de colônias	E.P.	F.S. (%)
Controle de células		73 ± 8,5	0.18 ± 0.02	100 ^{a, c}
A1 (coletada)	10 µg	21,7 ± 2,1	-	29,7 ± 2,9 ^b
	1 µg	55,0 ± 9,0	-	75,3 ± 12,3 ^{a, b}
B1 (ervanaria)	20 µg	101,0 ± 20,4	-	138,3 ± 28,0 ^c
	2 µg	250,0 ± 22,1	-	342,5 ± 30,2 ^d

Nº de colônias: média do número de colônias de cada triplicata com desvio padrão expresso; E.P.: Eficiência de Plaqueamento; F.S.: Fração Sobrevivente; Linhagens tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama que superexpressa receptores de estrogênio). Amostras: A1 = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B1 = folhas adquiridas em ervanaria em Piracicaba, SP. Extratos obtidos a partir de turbolização com diclorometano. Análise estatística por ANOVA, seguido de teste de Bonferroni (letras diferentes indicam diferenças significantes, $p \leq 0,05$).

5.2.3 Efeito (Anti) Estrogênico *in vitro* – Teste *E-screen*

Os efeitos sobre a proliferação celular da linhagem MCF7 foram avaliados utilizando duas concentrações dos extratos diclorometânicos (A1 e B1), na ausência e presença de 17 β -estradiol (E₂, 1 x 10⁻⁹). Nas condições empregadas, o E₂ não foi capaz de induzir proliferação celular (Tabela 9), inviabilizando a avaliação do efeito das amostras.

Tabela 9 - Efeito (anti)estrogênico dos extratos diclorometano obtidos das folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências em células MCF-7 seguindo o protocolo *E-screen*.

Tratamento		MCF7 (viabilidade %)	
		Ausência E ₂	Presença E ₂
Controle de células		100,0 ± 5,7	97,2 ± 7,8
A1	10 µg/mL	94,7 ± 4,6	84,2 ± 1,1
	1 µg/mL	104,5 ± 3,4	104,0 ± 5,6
B1	20 µg/mL	109,7 ± 5,4	94,6 ± 6,4
	2 µg/mL	112,3 ± 9,2	109,0 ± 0,5
Tamoxifeno*	15 µg/mL	146,0 ± 6,3	126,8 ± 3,1

Linhagens tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama que superexpressa receptores de estrógeno).

*Tamoxifeno: controle positivo de atividade antiestrogênica. Amostras: A1 = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B1 = folhas adquiridas em ervanaria em Piracicaba, SP. Extratos obtidos a partir de turbolização com diclorometano.

6 DISCUSSÃO

Além das substâncias do metabolismo primário, as células vegetais produzem uma grande variedade de metabólitos secundários. Esses metabólitos são sintetizados pelas plantas com a finalidade de interagirem com os demais organismos presentes no ambiente. Assim, esses compostos podem atuar como defesa contra herbívoros e patógenos ou ainda para atração de agentes polinizadores. Quimicamente, essas substâncias, conhecidas como produtos naturais, podem ser agrupadas em três grandes classes principais: alcaloides, terpenóides e compostos fenólicos (Brusotti *et al.*, 2014; Bernardini *et al.*, 2018; Suntar, 2019).

Em função de sua diversidade química, inúmeros produtos naturais exibem atividades farmacológicas, as quais explicam o uso milenar das plantas para fins medicinais. Assim, as pesquisas científicas inicialmente buscaram conhecer quimicamente esses compostos e a partir deles propor a síntese química dos mesmos e de derivados, que eram então obtidos com pureza, eficácia, potência e segurança aprimoradas. Desta forma, uma grande parte do arsenal terapêutico disponível atualmente foi construído (Cragg & Newman, 2013; Suntar, 2019). Em paralelo, diversos estudos demonstraram que, em muitas situações, os extratos vegetais eram mais ativos do que os compostos isolados dos mesmos. Esses resultados sugeriram possíveis efeitos sinérgicos entre as substâncias o que incentivou o desenvolvimento de fitoterápicos seguros e com custos relativamente menores do que os de medicamentos preparados com moléculas isoladas (Bernardini *et al.*, 2018).

Considerando que as plantas têm sido utilizadas para diversos fins desde o início da história da humanidade, a transmissão desse conhecimento através dos tempos é o objeto de estudo da etnobotânica e da etnofarmacologia. Enquanto a primeira busca resgatar as relações dos seres humanos com as plantas em geral, a segunda se detém no conhecimento de plantas utilizadas tradicionalmente como remédios. Duas medicinas tradicionais, a medicina tradicional chinesa e o ayurveda, possuem registros escritos muitos antigos que ainda são usados como referências para remédios fitoterápicos. No entanto, muitos usos tradicionais ainda são transmitidos apenas oralmente, sendo primordial o registro científico dessas informações sobre o uso tradicional de plantas medicinais (Brusotti *et al.*, 2014).

Com o intuito de verificar o que já havia sido estudado a respeito da utilização etnofarmacológica e composição química das partes de *Casearia sylvestris*, bem como suas atividades farmacológicas, foi feito um levantamento bibliográfico com as palavras-chaves “*Casearia sylvestris*” e “Ethno*” para as bases Bireme (Lilacs e Scielo), Pubmed (Medline), Scopus, Web of Science e Embase. Esse levantamento fundamentou as informações

apresentadas na introdução desta dissertação. Resumidamente, diversos estudos científicos, *in vitro* e *in vivo*, embasados por levantamentos etnofarmacológicos, comprovam que o óleo essencial e extratos das folhas de *C. sylvestris* apresentam várias atividades farmacológicas que sustentam a eficácia de sua utilização popular.

Com base nesse levantamento, observou-se que a composição química das folhas de *C. sylvestris* apresenta pequena variação em função da variedade estudada. Por isso, as análises fitoquímicas realizadas neste trabalho tiveram como objetivo comparar o perfil químico dos extratos preparados a partir de diferentes amostras de folhas de *C. sylvestris*, sendo duas amostras adquiridas em ervanarias de diferentes cidades (Piracicaba, SP e Campinas, SP) e uma coletada de um espécime cultivado no *campus* da Unicamp/Barão Geraldo.

A partir da coleta e da pesagem do material obtido, deu-se início ao processo de seleção de método extrativo. O processo de extração tem por objetivo transferir os metabólitos secundários produzidos por um organismo para um sistema solvente. A escolha da metodologia de extração mais apropriada depende das características físicas e químicas do material vegetal e das substâncias que serão extraídas. Além disso, o rendimento e a qualidade da extração também dependem da polaridade dos solventes utilizados, tempo e temperatura de extração e da proporção entre amostra e solvente (Dai & Mumper, 2010; Brusotti *et al.*, 2014). Com base nesses fatores, optou-se neste estudo por avaliar métodos sem a utilização de aquecimento e com agitação, sendo testados os métodos de turbulização com ultraturrax, agitação mecânica e agitação magnética.

Como não foi possível realizar moagem prévia do material vegetal, por falta de disponibilidade de moinho apropriado, as folhas secas foram fragmentadas grosseiramente com as mãos antes da extração. Através da análise visual dos resíduos vegetais e dos extratos fluidos obtidos (Figura 10), observou-se que o método de turbulização com ultraturrax mostrou-se o mais adequado, uma vez que por este método, foi possível promover a trituração do material vegetal, diminuindo o tamanho das partículas, simultaneamente à exposição ao solvente. O aumento da superfície de contato da amostra com o líquido solvente potencializa o processo extrativo garantindo que a maior parte dos metabólitos secundários seja transferido da matriz vegetal para o sistema solvente, reduzindo o tempo de extração e esgotamento da planta (Falkenberg, Dos Santos & Simões, 1999). Desta forma, para a comparação das amostras de folhas de *C. sylvestris* de diferentes procedências aplicou-se processo de extração por de turbulização.

Para realização das análises químicas e biológicas, foi necessário determinar a massa seca dos extratos. Os solventes orgânicos foram evaporados sob vácuo enquanto a água

residual foi eliminada sob jato de ar comprimido, na indisponibilidade de um liofilizador. Durante este processo, realizado a temperatura ambiente, os três extratos obtidos na ervanaria de Campinas foram contaminados por fungos e por isso foram descartados.

Após a secagem, os extratos foram pesados e o rendimento em relação à massa seca de folhas foi calculado. Para ambas as amostras, os extratos em EtOH 70% por extração direta apresentaram rendimentos maiores do que aqueles obtidos pela extração sucessiva (DCM seguido de EtOH 70%). Quando analisamos os resultados da extração sucessiva, a amostra coletada no *campus* da Unicamp/Barão Geraldo produziu um extrato DCM em rendimento cerca de três vezes maior do que o observado para a amostra obtida na ervanaria de Piracicaba, SP, sugerindo que as folhas do espécime coletado em Campinas apresentavam maior quantidade de substâncias com média a baixa polaridade (maior afinidade pelo DCM).

A composição dos metabólitos secundários das plantas depende de muitos fatores como condições edáficas (composição do solo), climáticas e de acordo com o período vegetativo e da saúde do organismo vegetal. Além disso, as condições de armazenamento, os processos de extração e isolamento de substâncias podem ocasionar transformação e degradação das substâncias originalmente presentes no material vegetal. Ainda, os extratos vegetais podem conter produtos naturais derivados de organismos endofíticos ou metabólitos produzidos pelas plantas como resultado da interação com estes microrganismos (Bernardini *et al.*, 2018; Buenz, Verpoorte & Bauer, 2018).

Mutações genéticas, observadas em cultivares e variedades de uma mesma espécie, podem resultar em modificações no metabolismo celular, por exemplo o bloqueio de alguma rota biossintética, e conseqüentemente em variações na produção de metabólitos secundários chegando até a quantidades não-detectáveis de algum metabólito esperado para a espécie (Dos Santos, 1999).

Bueno e colaboradores (2015) avaliaram o perfil químico dos extratos das folhas de duas variedades de *C. sylvestris* presentes no estado de São Paulo, Brasil. Os achados desse estudo indicaram a prevalência de diterpenos do tipo clerodano nas folhas de *C. sylvestris* variedade *sylvestris*, enquanto compostos fenólicos predominaram nas folhas de *C. sylvestris* var. *língua*.

Considerando esse perfil descrito para a espécie (Bueno *et al.*, 2015), avaliamos por técnicas colorimétricas e cromatográficas as duas amostras selecionadas de folhas de *C. sylvestris*, ambas inicialmente identificadas sem a designação de variedade. Para quantificação do teor de compostos fenólicos totais utilizou-se da análise colorimétrica baseada na reação de redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos presentes na amostra, o que

leva a formação de complexos de coloração azul cuja intensidade aumenta linearmente em função da concentração de compostos fenólicos (Oliveira *et al.*, 2009). Esse valor de intensidade de absorvância é então convertido em concentração a partir de uma curva de calibração de um composto fenólico de referência. O ácido gálico (EAG) é o composto fenólico mais comumente utilizado para esta análise, sendo os resultados expressos em mg equivalente de EAG (Dai & Mumper, 2010).

Não foi possível detectar compostos fenólicos nos extratos preparados com o solvente diclorometano, de baixa/média polaridade (A1 e B1). Notou-se que os extratos hidroetanólicos B2 e B3 (ervanaria) apresentaram teores de compostos fenólicos similares entre si enquanto o extrato hidroetanólicos A2, por extração sucessiva, apresentou maior teor de compostos fenólicos em relação ao extrato A3, preparados diretamente com EtOH 70%. Este último resultado sugeriu que esta classe de compostos poderia estar diluída em outras substâncias no extrato direto.

Bueno e colaboradores (2015) desenvolveram um método para análise de diterpenos do tipo clerodano e compostos fenólicos de *C. sylvestris* através de cromatografia de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (UHPLC-DAD). Na ausência de equipamento e detector semelhante ao descrito na metodologia, a análise foi realizada com base neste protocolo, porém com modificações. Ao invés de UHPLC foi utilizado HPLC, um cromatógrafo com velocidade menor, fazendo com que um maior tempo de corrida fosse ajustado para as análises realizadas. O detector DAD foi substituído por detector UV-VIS ajustado nos dois comprimentos de onda referenciados no protocolo, permitindo detectar as moléculas que possuem grupos cromóforos, porém sem fornecer os espectros de varredura que poderiam ser obtidos pelo detector DAD.

Por ser simples e relativamente barata, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta (HPLC-UV) é amplamente utilizada em diversas farmacopeias no controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos ou fitopreparações e para quantificação de compostos individuais. As informações espectrais UV-vis adicionais do detector DAD permitem registrar os cromatogramas em ampla gama de comprimentos de onda, possibilitando análises qualitativa e quantitativa dos picos em um cromatograma. Em comparação com HPLC, a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) aumenta a velocidade da análise, permite maior eficiência e resolução da separação, maior sensibilidade e menor consumo de solvente (Brusotti *et al.*, 2014).

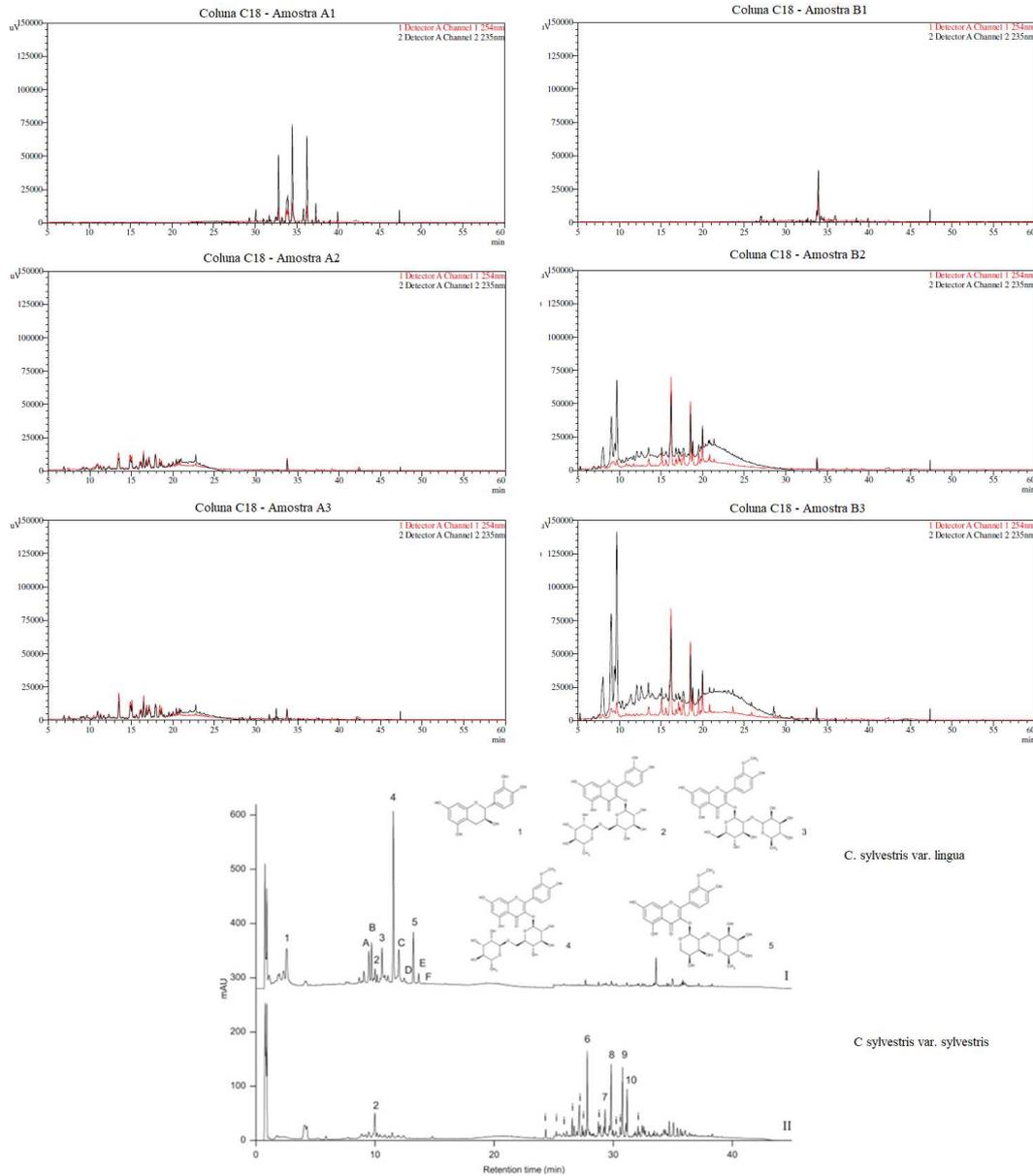
Os cromatogramas dos extratos de *Casearia sylvestris* de diferentes procedências, obtidos por HPLC-UV em coluna analítica C18, quando relacionados aos cromatogramas

obtidos por UHPLC-DAD, por Bueno e colaboradores (2015) (Figura 21) e associados ao resultado da análise de teor de fenólicos totais, permitem sugerir que os compostos eluídos na primeira metade da corrida (até 30 minutos) correspondem aos compostos fenólicos identificados por Bueno e colaboradores (2015), eluídos também na primeira metade da corrida (até 20 minutos). Quercetina, substância utilizada como padrão de flavonoide neste trabalho, foi eluído em aproximadamente 24 minutos de corrida.

Assumindo essa condição de eluição, foi possível evidenciar teores muito baixos ou não detectáveis de compostos fenólicos nos cromatogramas dos extratos diclorometânicos A1 e B1, corroborando as análises por CCD e de teor de fenólicos totais. Por sua vez, os cromatogramas dos extratos hidroetanólicos B2 e B3, das folhas adquiridas em ervanaria, apresentaram sinais mais intensos na região dos compostos fenólicos do que aqueles observados nos cromatogramas dos extratos A2 e A3 (folhas coletadas no *campus*). No entanto, apenas o teor de compostos fenólicos de A3 foi significativamente menor do que o observado para B2 e B3.

De maneira semelhante, foi possível sugerir que as moléculas eluídas na segunda metade da corrida cromatográfica (entre 35-40 minutos - HPLC) corresponderiam aos diterpenos de tipo clerodano identificados por Bueno e colaboradores (2016) também na segunda metade da corrida (entre 25-35 minutos - UHPLC). Desta forma, os cromatogramas dos extratos diclorometânicos A1 e B1 apresentaram maior quantidade de picos correspondentes a essas substâncias do que os obtidos com EtOH 70%, sendo o extrato A1 (coletada no *campus*) mais rico em diterpenos do que o obtido da ervanaria de Piracicaba (amostra B).

Figura 21 - Comparação entre cromatogramas gerados nas análises de folhas de *C. sylvestris* obtidas de diferentes procedências.



A) Amostras: A = folhas coletadas no campus Unicamp/Barão Geraldo; B = folhas adquiridas em ervanaria em Piracicaba, SP. Extratos obtidos a partir de turbulização direta com diclorometano (1), sucessiva com EtOH 70% (2) ou a partir de turbulização direta com EtOH 70% (3). Fase estacionária: Coluna C18. Fase móvel: água deionizada acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) em gradiente de eluição (10–25% de B de 0 a 15 min, 25–90% de B até 35 min, mantendo 90% de B até 55 min retornando à condição inicial em 2 min com tempo de equilíbrio de 3 min). Vazão do fluxo: 1 mL/min; Temperatura do forno: 35° C; Volume de injeção: 10 µL; Concentração das amostras: A1 = 1,7 mg/mL, A2 = 1,4 mg/mL, A3 = 1,7 mg/mL, B1 = 1,8 mg/mL, B2 = 2,1 mg/mL, B3 = 2,1 mg/mL. Eixo X (vertical) = densidade óptica; Eixo Y (horizontal) = tempo (min). Fonte: A autora.

B) Amostras: I = folhas *C. sylvestris* var. *lingua*; II = folhas *C. sylvestris* var. *sylvestris*. Extratos obtidos a partir de sonicação direta com água:etanol:isopropanol (50:30:20% v/v). Fase estacionária: Coluna C18 (Kinetex 150

mm x 2.1; 2.6 μm , 100 \AA). Fase móvel: água deionizada (A) e acetonitrila (B) em gradiente de eluição (10–25% de B de 0 a 15 min, 25–90% de B até 35 min, mantendo 90% de B até 55 min retornando à condição inicial em 2 min com tempo de equilíbrio de 3 min). Vazão do fluxo: 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; Temperatura do forno: 35° C; Volume de injeção: 2 μL ; Concentração das amostras: 50 mg/mL. Eixo X (vertical) = densidade ótica; Eixo Y (horizontal) = tempo (min). Flavonóides de *C. sylvestris* var. *lingua*: catequina (1); rutina (2); isoramnetina-3-O-norospiridido (3); narcissina (4); isoramnetina-3-O-a-L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-a-L-arabinopiranosido (5). As letras de A a F correspondem aos flavonóides identificados por identificações putativas. Diterpenos de *C. sylvestris* var. *sylvestris*: casearina D (6); Caseargrewiina F (7); casearina S (8); casearina I (9); casearina J (10). O símbolo (i) corresponde aos diterpenos de clerodano identificados por meio de seus espectros UV característicos. Fonte: Bueno *et al.*, 2015.

Com base nesse resultado, realizou-se uma segunda análise por HPLC-UV substituindo-se a coluna cromatográfica C18 pela coluna cromatográfica CN. A presença dos grupos ciano alifáticos, que são bons receptores de ligações de hidrogênio, faz com que a fase estacionária apresente um momento dipolar muito alto. A retenção é regida principalmente pela acidez e pela dipolaridade dos compostos. A coluna CN se mostra adequada para análise de lipídios e substâncias lipossolúveis (Blackwell, Stringham & Weckwerth, 1997; Bamba *et al.*, 2008; Lesellier & West, 2014).

Considerando o caráter lipossolúvel dos terpenóides (Simões & Spitzer, 1999), os cromatogramas gerados para as amostras analisadas na coluna CN apresentaram picos mais finos, com melhor resolução e maior intensidade na região onde eram esperados os terpenos (20-35 minutos). A amostra A1 apresentou a maior quantidade e intensidade de picos nesta coluna, seguida da amostra B1, corroborando com os resultados anteriores que sugerem maiores teores de terpenóides nos extratos diclorometânicos. Os picos com base alargada, eluídos no início da corrida (0-20 minutos), provavelmente corresponderiam aos compostos fenólicos, e foram mais representativos nos extratos hidroetanólicos da amostra adquirida em ervanaria (B2 e B3).

Com base nas informações descritas na literatura (Bueno *et al.*, 2015) e os dados obtidos experimentalmente neste estudo, seria possível sugerir pela análise do perfil químico que o espécime cultivado no campus Unicamp/Barão Geraldo seria *C. sylvestris* var. *sylvestris*, enquanto a amostra obtida na ervanaria de Piracicaba seria representativa de um espécime de *C. sylvestris* var. *língua*.

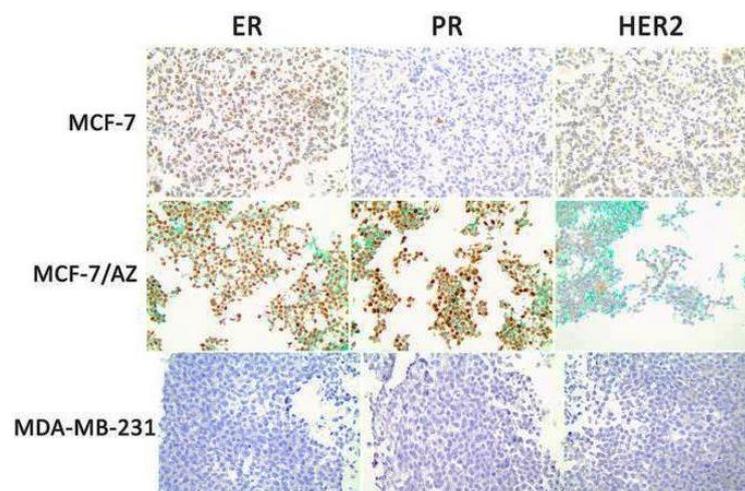
Essa variação no perfil químico pode impactar os efeitos farmacológicos e/ou tóxicos produzidos pelo consumo desse extrato. Como os estudos prévios descreveram a atividade anticâncer como uma das principais para os extratos de *C. sylvestris*, escolhemos os testes de atividade antiproliferativa e clonogênico *in vitro* para a comparação dos extratos.

Ainda, como a atividade antiproliferativa em linhagens de mama hormônio-dependente poderia estar relacionada com ação (anti)estrogênica, optamos pela realização do teste *E-screen in vitro*.

Para diluição das amostras em meio de cultivo de células empregou-se o dimetilsulfóxido (DMSO) como agente dispersante. O DMSO é um co-solvente de baixa toxicidade que apresenta grande capacidade de solubilizar uma ampla variedade de compostos, favorecendo a posterior diluição em meio aquoso (De Souza, 2019). Além disso, no esquema de diluição empregado, a concentração final de DMSO sempre foi igual ou inferior a 0,25%, concentração esta que não interfere na viabilidade celular (Fiorito, 2016).

Para avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos de *C. sylvestris* [extratos sucessivos em diclorometanos (A1 e B1) e em EtOH 70% (A2 e B2) e extratos diretos em EtOH 70% (A3 e B3)] foi selecionado um painel celular formado por 5 linhagens tumorais e 2 não tumorais, todas humanas (Tabela 4). Além das linhagens de glioblastoma U251, adenocarcinoma de pulmão NCI-H460 (tipo não pequenas células) e HaCaT (queratinócitos humanos, não tumoral), foram avaliadas quatro linhagens de mama, a saber, MCF 10A (células epiteliais mamárias, não-tumoral), MCF-7 (adenocarcinoma de mama, ER+), MCF-7/AZ (adenocarcinoma de mama, superexpressão de ER+ e PR+) e MDA-MB-231 (carcinoma de mama, triplo negativo) (Figura 22).

Figura 22- Imunohistoquímica representativa para os receptores ER, PR e HER2 nas linhagens tumorais de células mamárias humanas, MCF-7 (ER+), MCF-7/AZ (ER+, PR+) e MDA-MB-231 (triplo negativo).



Barra de escala = 100 μ M. ER = receptor de estrogênio; PR = receptor de progesterona; HER2 = fator de crescimento epidérmico humano. Fonte: Mota *et al.*, 2017, com adaptações.

A partir dos dados experimentais de proliferação celular (%) de cada linhagem foi calculada uma concentração efetiva para cada um dos seis extratos testados. De acordo com o modelo NCI60 (Monks *et al.*, 1991; Shoemaker, 2006), das três concentrações efetivas que poderiam ser calculadas nesse modelo, a que melhor expressava o perfil de atividade dos extratos de *C. sylvestris* foi a concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular (TGI). Este parâmetro sugere que a amostra em estudo apresenta tanto efeito citostático quanto citocida em função da concentração.

Desta forma, foi possível evidenciar que o efeito antiproliferativo dos extratos de *C. sylvestris* foi influenciado pela variação na composição química. Assim, os extratos diclorometânico A1 e B1 foram mais ativos do que todos os hidroetanólicos. Comparando os resultados dos extratos das folhas de *C. sylvestris* coletada no campus Unicamp/Barão Geraldo com aqueles provenientes da amostra adquirida em ervanaria, foi evidente o maior efeito nas amostras para as quais houve indicativo da presença de compostos terpênicos (extratos A1, B1 e A3). Ainda, o extrato A1 apresentou atividade de moderada a potente frente as linhagens de mama (MCF7, MCF7/AZ, MCF10A, MDA-MB-231), glioblastoma (U251) e queratinócitos (HaCaT). Esses resultados sugeriram que essa atividade pode estar relacionada, em parte, à presença dos compostos terpênicos.

O efeito sobre diferentes linhagens de células tumorais já foi descrito anteriormente para extratos e óleo essencial de *C. sylvestris* (Tabelas 1 e 2). Vários estudos elucidaram a importância dos diterpenos clerodânicos (casearinas e casearvestrinas) para o efeito antitumoral, inclusive com descrição de mecanismos pelos quais essas moléculas interferem na proliferação e induzem morte celular (Itokawa *et al.*, 2000; Oberlies & Burgess, 2002; Ferreira *et al.*, 2014). Além dos diterpenos, os sesquiterpenos identificados no óleo essencial das folhas de *C. sylvestris* também contribuem para o efeito antiproliferativo (Tabela 1).

Considerando o desempenho no teste de atividade antiproliferativa, optou-se pela continuidade dos estudos *in vitro* com os extratos A1 e B1 frente a linhagem tumoral de mama (MCF7). A partir dos valores de TGI, foram estimadas as maiores concentrações que não interfeririam na proliferação celular para a utilização no teste clonogênico.

A capacidade das células cancerígenas de formar colônias é indispensável para a disseminação de um tumor maligno para órgãos distantes. Portanto, compostos químicos que regulam negativamente a progressão do ciclo celular são úteis para a terapia do câncer (Ferreira-Silva *et al.*, 2017). No teste clonogênico, o extrato A1 foi capaz de gerar dano permanente às células tratadas, reduzindo de maneira significativa o número de colônias formadas e de maneira dependente da concentração.

Dados da literatura indicam que esse efeito permanente sobre a proliferação celular pode ser atribuído aos diterpenos clerodânicos. Estudos *in vitro* mostraram que a casearina D, isolada das folhas de *C. sylvestris*, foi capaz de inibir a capacidade clonogênica da linhagem tumoral hepática HepG2, induzindo parada no ciclo celular em fase G1/S, inibindo fosforilação de ERK e reduzindo a expressão gênica de ciclina D1, resultando em uma redução de 97% das colônias em culturas tratadas na concentração de 6 µg/mL (Ferreira-Silva *et al.*, 2017).

Corroborando essa evidência, o extrato B2 apresentou um efeito proliferativo inversamente proporcional à concentração testada. Como foi evidenciado pelas análises química e cromatográficas um teor maior de compostos fenólicos nesse extrato, é possível supor que esse efeito proliferativo possa ser atribuído a compostos fenólicos com ação estrogênica.

Fitoestrógenos são substâncias derivadas de plantas que tem atividade estrogênica por apresentarem similaridade estrutural com o estrogênio. De acordo com sua estrutura química são classificados em seis principais grupos: flavonas, flavononas, isoflavonas, cumestanos, lignanas e estilbenos. Essas substâncias ao se ligarem aos receptores de estrógeno (ERs) irão modular as ações mediadas por esses receptores dependendo do tecido no qual estão localizados (Senthilkumar *et al.*, 2018).

A estrogenicidade de um composto pode ser constatada *in vitro* por uma série de ensaios e é refletida por seu efeito na proliferação de células positivas para receptores de estrogênicos (Leusch *et al.*, 2010). O ensaio *E-screen* determina a (anti)estrogenicidade de compostos através da proliferação de células MCF-7, uma linhagem celular de adenocarcinoma mamário que superexpressa receptores de estrógeno e expressa aromatase e 5 α -redutase como outras células esteroideogênicas. É considerado um teste robusto, com boa sensibilidade e reprodutibilidade, sendo utilizado tanto para análise de potenciais fármacos quanto de contaminantes ambientais. Uma das limitações deste modelo, é que mitógenos sem ação estrogênica podem influenciar a proliferação celular, resultando em respostas não específicas (Leusch *et al.*, 2010; Resende *et al.*, 2013).

Dando continuidade aos estudos dos extratos A1 e B1, estes foram avaliados no modelo *E-screen*. Com este modelo, buscávamos evidenciar se a ação antiproliferativa sobre as linhagens tumorais de mama estaria relacionada a uma ação sobre receptores ER e ainda se a ação proliferativa observada após a exposição a baixa concentração de B1 poderia ser atribuída a ação estrogênica das substâncias presentes nesse extrato.

Isso porque, dentre os compostos fenólicos já descritos como constituintes das folhas de *C. sylvestris*, encontram-se pelo menos 6 diferentes neolignanas, as casearialignanas A – F, além de ácido elágico e alguns de seus derivados (ácido 3'-*O*-metil elágico, 3,3'-*di-O*-

metil elágico e 3-*O*-metil-3',4'-metilenodioxi elágico) e 2 diferentes esteróides (daucosterol e stigmasterano-3 β ,6 α -diol) (Xia *et al.*, 2015), os quais poderiam atuar como fitoestrógenos em função de suas estruturas.

Apesar dos cuidados tomados para minimizar interferentes externos (uso de meio de cultura sem vermelho fenol, soro fetal bovino 5%, tratado com carvão ativo para redução de teor de hormônios esteroidais), não foi possível evidenciar a ação proliferativa induzida por 17 β -estradiol (E2) em células MCF7. Assim, nas condições experimentais realizadas, não foi possível inferir se os extratos A1 e B1 apresentavam algum efeito anti/estrogênico. Uma hipótese para o insucesso do experimento é que o E2 pode ter se degradado, por expiração do prazo de validade ou por problemas de acondicionamento durante o transporte entre laboratórios.

Segundo as Resoluções da Diretoria Colegiada, RDCs no. 18, de 03 de abril de 2013, e N° 26, de 13 de maio de 2014, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (MS, 2013 e 2014), para medicamentos fitoterápicos e para produto tradicional fitoterápico a identificação da espécie vegetal em uso deve seguir a nomenclatura completa, ou seja, nome da espécie formado por gênero mais epíteto específico, seguido dos nomes do autor do binômio (botânico que classificou pela primeira vez a espécie) e, quando aplicável, a designação de variedade seguida do nome da família botânica. No entanto, para drogas vegetais, definidas como “planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada” não a especificação sobre a denominação botânica.

Em nosso estudo, uma amostra de folhas de *C. sylvestris* foi adquirida como droga vegetal em uma ervanaria de Piracicaba. No rótulo dessa amostra constava apenas a descrição de gênero e epíteto específico, sem menção a designação de variedade. Como nosso estudo demonstrou, em conjunto com todos os dados já reportados para *C. sylvestris*, a identificação correta da variedade é extremamente importante. As duas variedades de *C. sylvestris* descritas, var. *lingua* e var. *sylvestris*, apresentam diferenças na composição química que irão influenciar nos efeitos farmacológicos e tóxicos.

7 CONCLUSÃO

Através do emprego de diferentes técnicas cromatográficas e colorimétricas, foi possível comparar o perfil químico de duas amostras de folhas de *Casearia sylvestris* obtidas de diferentes procedências. No presente estudo, foi evidenciada a presença de substâncias terpênicas e fenólicas nos extratos de folhas de *C. sylvestris* sendo que a amostra coletada no campus Unicamp/Barão Geraldo apresentou maior teor de substâncias terpênicas enquanto a adquirida em erva-mate mostrou-se mais enriquecida em compostos fenólicos. Essas diferenças são compatíveis com os relatos para a composição química de *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua*, respectivamente. Esta variação refletiu-se em diferenças significativas nos efeitos farmacológicos. Desta forma, evidenciou-se que o extrato com maior teor de terpenos, além de apresentar atividade antiproliferativa mais potente, manteve o efeito inibitório mesmo após sua retirada do meio de cultivo (efeito antiproliferativo não reversível). Por outro lado, o extrato com menor teor de terpenos, apesar do efeito antiproliferativo inicial, apresentou efeito proliferativo residual, o qual poderia ser atribuído, parcialmente, às lignanas já identificadas e descritas em *C. sylvestris*. Os dados obtidos neste estudo corroboram o uso terapêutico das folhas de *C. sylvestris* e reforçam a importância da correta identificação botânica de uma espécie vegetal, incluindo a designação de variedade, para a comercialização de drogas vegetais. Desta forma, os usuários de plantas medicinais poderiam usufruir adequadamente dos efeitos terapêuticos que cada espécie pode proporcionar.

REFERÊNCIAS

- Albano MN, da Silveira MR, Danielski LG, Florentino D, Petronilho F, Piovezan AP. Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **J Ethnopharmacol.** v.147, p.612-7, 2013. doi: 10.1016/j.jep.2013.03.049.
- Alves RC, Costa AS, Jerez M, Casal S, Sineiro J, Núñez MJ, Oliveira B. Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. **J Agric Food Chem.** v.58, p.12221-9, 2010. doi: 10.1021/jf1031229.
- Ameni AZ, Latorre AO, Torres LM, Górnaiak SL. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). **J Ethnopharmacol.** v.175, p.9-13, 2015. doi: 10.1016/j.jep.2015.08.027.
- Anandhi Senthilkumar H, Fata JE, Kennelly EJ. Phytoestrogens: The current state of research emphasizing breast pathophysiology. **Phytother Res.**, v.32, p.1707-1719, 2018. doi: 10.1002/ptr.6115.
- Anselmo AF, Silva CG, Marinho MG, Zanella FCV, Xavier DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas por raizeiros em uma feira livre no município de Patos – PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, vol. especial, p. 39-48, Campina Grande, 2012. Disponível em:<
- Antinarelli LM, Pinto NC, Scio E, Coimbra ES. Antileishmanial activity of some brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. **Anais Acad Bras Cienc.**, v.87, p.733-742, 2015. doi: 10.1590/0001-3765201520140288
- Arisawa EAL, Silva CMOM, Cardoso CAC, Lemos NRP, Pinto MC. Efeitos colaterais da terapia antitumoral em pacientes submetidos à químico e à radioterapia. **Rev. Biociên**, v.11, p.55-61, 2005. Disponível em: <
<http://periodicos.unitau.br/ojs/index.php/biociencias/article/view/188>>

Bamba T, Shimonishi N, Matsubara A, Hirata K, Nakazawa Y, Kobayashi A, Fukusaki E. High throughput and exhaustive analysis of diverse lipids by using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for metabolomics. **J Biosci Bioeng.**, v.105, p.460-9, 2008. doi: 10.1263/jbb.105.460.

Bernardini S, Tiezzi A, Laghezza Masci V, Ovidi E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Nat Prod Res.**, v.32, p.1926-1950, 2018. doi: 10.1080/14786419.2017.1356838.

Blackwell JA, Stringham RW, Weckwerth JD. Effect of mobile phase additives in packed-column subcritical and supercritical fluid chromatography. **Anal Chem.** v.69, p.409-15, 1997. doi: 10.1021/ac9608883.

Bou DD, Lago JH, Figueiredo CR, Matsuo AL, Guadagnin RC, Soares MG, Sartorelli P. Chemical composition and cytotoxicity evaluation of essential oil from leaves of *Casearia sylvestris*, its main compound α -zingiberene and derivatives. **Molecules.** v.8, p.9477-87, 2013. doi: 10.3390/molecules18089477.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos, 2006. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União 2014; 13 maio. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 18, de 03 de abril de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e officinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0018_03_04_2013.pdf>

Brasil. Ministério do Meio Ambiente (MA). Biodiversidade. 2017. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/biodiversidade.html>>

Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: the role of analysis in the ethnopharmacological approach. **J Pharm Biomed Anal.**, v.87, p.218-28, 2014. doi: 10.1016/j.jpba.2013.03.007.

Buccioli PT, Bortolin RH, Furini GT, Cincotto DU, Sousa JH, França SC, Oliveira LRA, Pereira PS. Antihyperglycemic Effect of *Casearia sylvestris* Leaves Extract in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.31, p.421-6, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/287499626_Antihyperglycemic_Effect_of_Casearia_sylvestris_Leaves_Extract_in_Streptozotocin_Induced_Diabetic_Rats>

Bueno PC, Pereira FM, Torres RB, Cavalheiro AJ. Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultrahigh performance liquid chromatography combined with chemometric tools. **J Sep Sci.**, v.38, p.1649-56, 2015. doi: 10.1002/jssc.201401421.

Bueno PCP, Passareli F, Anhesine NB, Torres RB, Cavalheiro AJ. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety *lingua* (Salicaceae). **Biochem. Syst. Ecol.** v.68, p.23–26, 2016. doi: 10.1016/j.bse.2016.06.002

Buenz EJ, Verpoorte R, Bauer BA. The Ethnopharmacologic Contribution to Bioprospecting Natural Products. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v.58, p.509-530, 2018. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052703.

Cavalcante WL, Campos TO, Dal Pai-Silva M, Pereira PS, Oliveira CZ, Soares AM, Gallacci M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J Ethnopharmacol.**, v.112, p.490-7, 2007. doi: 10.1016/j.jep.2007.04.002

Cragg GM, Newman DJ. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod.**, v.79, p.629-61, 2016. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.

Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta.**, v.1830, p.3670-95, 2013. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008.

Da Silva AC, Balz D, de Souza JB, Morsch VM, Corrêa MC, Zanetti GD, Manfron MP, Schetinger MR. Inhibition of NTPDase, 5'-nucleotidase, Na⁺/K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine.**, v.13, p.509-14, 2006. doi: 10.1016/j.phymed.2005.01.011.

Da Silva SL, Chaar JDS, Figueiredo PDMS, Yano T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). **Eur J Pharmacol.** v.608, p.76-83, 2009. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.02.004

Da Silva SL, Chaar JDS, Figueiredo PDMS, Yano T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica.** v.38, p.107-112, 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672008000100012>

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, p.7313-52, 2010. doi: 10.3390/molecules15107313.

De Araújo ÉJF, de Almeida AAC, Silva OA, da Costa IHF, Rezende-Júnior LM, Lima FDCA, Cavalheiro AJ, Pessoa C, de Moraes MO, Ferreira PMP. Behavioral effects induced by antitumor clerodane diterpenes from *Ceaseria sylvestris* and in silico interactions with neuron receptors. **J Ethnopharmacol**, v.198 p.460–467, 2017. doi: 10.1016/j.jep.2017.01.006.

De Campos EP, Trombini LN, Rodrigues R, Portella DL, Werner AC, Ferraz MC, de Oliveira RV, Cogo JC, Oshima-Franco Y, Aranha N, Gerenutti M. Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents. **BMC Res Notes.**, v.8, p.269, 2015. doi: 10.1186/s13104-015-1251-4.

De Mattos ES, Frederico MJS, Colle TD, de Pieri DV, Peters RR, Piovezan AP. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **J**

Ethnopharmacol., v.112, p.1-6, 2007. doi: 10.1016/j.jep.2007.01.034.

De Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J Ethnopharmacol.**, v.123, p.439-445, 2009. doi: 10.1016/j.jep.2009.03.018.

De Mesquita ML, de Paula JE, Pessoa C, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS. Antileishmanial and trypanocidal activity 150 of Brazilian Cerrado plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.100, n.7, p.783-787, 2005. doi: 10.1590/S0074-02762005000700019

De Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, de Paula JE, Espindola LS. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **J Ethnopharmacol.**, v.110, p.165-70, 2007. doi: 10.1016/j.jep.2006.09.015

De Paula RC, Sanchez EF, Costa TR, Martins CHG, Pereira PS, Lourenço MV. Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. **J Venomous Anim Toxins Incl Trop Dis**, v.16, p.311-323, 2010. doi: 10.1590/S1678-91992010000200012

De Souza, LB. Potencial antitumoral do extrato etanólico e frações de *Mentha aquatica* L. Dissertação (Mestrado em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, 101 p., 2019. Disponível em: < http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/333828/1/Souza_LucianaBitencourtDe_M.pdf>

Degani AL, Cass QL, Viera PC. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v.7, p.21-25, 1998. Disponível em: < <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/actual.pdf>>

Dorigoni PA, Ghedini PC, Fróes LS, Baptista KC, Ethur ABM, Baldisserotto B, Bürger ME, Almeida CE, Lopes AM, Záchia RA. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil. I – Relação entre enfermidades e

espécies utilizadas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 4, n. 1, p. 69-79, 2001. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284804488_Levantamento_de_dados_sobre_plantas_medicinais_de_uso_popular_no_municipio_de_Sao_Joao_do_Polesine_RS_Brasil_i_-_Relacao_entre_enfermidades_e_especies_utilizadas>

Dos Santos AG, Ferreira PM, Vieira Júnior GM, Perez CC, Gomes Tininis A, Silva GH, Bolzani Vda S, Costa-Lotufo LV, Pessoa Cdo O, Cavalheiro AJ. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chem Biodivers**. v.7, p.205-15, 2010. doi: 10.1002/cbdv.200800342.

Dos Santos, RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Cap.16, p.323-354.

Espinosa J, Medeiros LF, Souza A, Güntzel ARC, Rücker B, Casali EA, Ethur EM, Wink MR, Torres ILS. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* Sw exhibits in vitro antioxidant and antimicrobial activities and in vivo hypolipidemic effect in rats. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.2, p.305-315, 2015. doi: 10.1590/1983-084X/13_074.

Falkenberg MC, Santos, RI, Simões CMO. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões CMO *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Cap.10, p.163-180.

FDCA, Cavalheiro AJ, Pessoa C, de Moraes MO, Ferreira PMP, Felipe KB, Kwiecinski MR, da Silva FO, Bücken NF, Farias MS, Castro LS, de Souza Grinevicius VM, Motta NS, Correia JF, Rossi MH, Pedrosa RC. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **J Ethnopharmacol**. v.155, p.1492–1499, 2014. doi: 10.1016/j.jep.2014.07.040

Ferreira PM, Santos AG, Tininis AG, Costa PM, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in

leukemia cells triggered by apoptosis. **Chem Biol Interact.** v.188, p.497–504, 2010. doi: 10.1016/j.cbi.2010.08.008

Ferreira PM, Santos AG, Tininis AG, Costa PM, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** v.83, n.4, p.355-361, 2011. doi: 10.1590/S0001-37652011005000040

Ferreira PM, Santos AG, Tininis AG, Costa PM, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions,** v.222, p.112–125, 2014. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.015

Ferreira PMP, Bezerra DP, Silva JDN, da Costa MP, Ferreira JRO, Alencar NMN, Figueiredo IST, Cavalheiro AJ, Machado CML, Chammass R, Alves APNN, Moraes MO, Pessoa C. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. **J Ethnopharmacol.** v.186, p.270–279, 2016. doi: 10.1016/j.jep.2016.04.011.

Ferreira-Silva GÁ, Lages CCL, Sartorelli P, Hasegawa FR, Soares MG, Ionta M. Casearin D inhibits ERK phosphorylation and induces downregulation of cyclin D1 in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro,** v.38, p.27–32, 2017. doi: 10.1016/j.tiv.2016.10.011.

Fialho SS, Nogueira GM, Duarte CA, Paiva Neto AO, Macoris DG. *Casearia sylvestris* on gastric permeability to sucrose in horses submitted to gastric ulcer induction protocol. **Cienc Rural,** v.40, p;348-355, 2010. doi: 0.1590/S0103-84782010000200014.

Fiorito GF, Atividade antiproliferativa e ação estrogênica/antiestrogênica de extratos e frações de algumas espécies de *mentha* (Lamiaceae). Tese (Doutorado na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica). **Universidade Estadual de Campinas.** Piracicaba. 2016.

Disponível em: <

http://taurus.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/304965/1/Fiorito_GiovannaFrancisco_D.pdf>

Flausino OJ, Abissi BM, Vieira GM, Santos AG, Silva DH, Cavaleiro A, Bolzani VS. Protease inhibition activity of extracts from Salicaceae species from Brazilian Cerrado and Atlantic Rain Forest and of an enriched fraction of clerodane diterpenes (casearins). **Braz J Pharamacogn.** v.19, p.755-758, 2009. doi: 10.1590/S0102-695X2009000500018.

Fouche G, Cragg GM, Pillay P, Kolesnikova N, Maharaj VJ, Senabe J. In vitro anticancer screening of South African plants. **J Ethnopharmacol.**, v.119, p.455-61, 2008. doi: 10.1016/j.jep.2008.07.005.

Franchi LP, Santos RA, Matsubara EY, Lima JC, Rosolen J, Takahashi CMS. Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v.35, p.571-580. doi: 10.1590/S0100-40422012000300025

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nat Protoc.**, v.1, p.2315-9, 2006. doi: 10.1038/nprot.2006.339

Gusman GS, Campana PR, Castro LC, Castilho RO, Teixeira MM, Braga FC. Evaluation of the Effects of Some Brazilian Medicinal Plants on the Production of TNF- α and CCL2 by THP-1 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Article ID 497123, 2015. doi: 10.1155/2015/497123.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf>

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>>

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. O que é câncer? Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer.>>

Itokawa H, Takeya K, Hitotsuyanagi Y, Morita H. Anti tumor compounds isolated from higher plants. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**. v.24, Part E, p.269-350, 2000. doi: 10.1248/yakushi1947.119.8_529

Khazir J, Mir BA, Pilcher L, Riley DL, Role of plants in anticancer drug Discovery. **Phytochemistry**, v.7, p.173-181, 2014. doi: 10.1016/j.phytol.2013.11.010

Kellogg JJ, Paine MF, McCune JS, Oberlies NH, Cech NB. Selection and characterization of botanical natural products for research studies: a NaPDI center recommended approach. **Natural Products Report** v.36, p.1196-1221, 2019. doi: 10.1039/c8np00065d.

Lesellier E, West C. The many faces of packed column supercritical fluid chromatography-a critical review. **J Chromatogr A.**, v.1382, p.2-46, 2015. doi: 10.1016/j.chroma.2014.12.083.

Leusch FD, de Jager C, Levi Y, Lim R, Puijker L, Sacher F, Tremblay LA, Wilson VS, Chapman HF. Comparison of five in vitro bioassays to measure estrogenic activity in environmental waters. **Environ Sci Technol.**, v.44, p.3853-60, 2010. doi: 10.1021/es903899d.

Lipinski LC, de Figueiredo Wouk AFP, Da Silva NL, Perotto D, Ollhoff RD. Effects of 3 topical plant extracts on wound healing in beef cattle. **Afr J Trad Complement Altern Med.**, v.9, p.542-547, 2012. doi:10.4314/ajtcam.v9i4.11

Lopez V. Are traditional medicinal plants and ethnobotany still valuable approaches in pharmaceutical research? **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v.10, p.3-10, 2011. Disponível em :<
https://www.researchgate.net/publication/236854556_Are_traditional_medicinal_plants_and_ethnobotany_still_valuable_approaches_in_pharmaceutical_research>

Lorencetti A, Simonetti JP. As estratégias de enfrentamento de pacientes durante o tratamento de radioterapia. **Revista Latino-Americana de Enfermagem.**, v. 13, n. 6, p. 944-950, 2005. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/29800>>.

Lorenzi H, Matos FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2ª Edição, Instituto Plantarum. Nova Odessa, São Paulo. 2008.

Menezes PR, Schwarz EA, Santos CA. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v.75, p.398-400, 2004.doi: 10.1016/j.fitote.2004.01.014

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J Natl Cancer Inst.**, v.83, p.757-66, 1991. doi: 10.1093/jnci/83.11.757

Moreira DL, Guarim-Neto G. Usos múltiplos de plantas do cerrado: um estudo etnobotânico na comunidade Sítio Pindura, Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. **Polibotânica** n.27, p.159-190, 2009. Disponível em: <
https://www.researchgate.net/publication/237217702_Usos_multiplos_de_plantas_do_cerrado_Um_estudo_etnobotanico_na_comunidade_Sitio_Pindura_Rosario_Oeste_Mato_Grosso_Brasil>

Moreira RRD, Santos AGD, Carvalho FA, Perego CH, Crevelin EJ, Crotti AEM, Cogo J, Cardoso MLC, Nakamura CV. Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v.61, e.33, 2019. doi: 10.1590/S1678-9946201961033

Mota AL, Evangelista AF, Macedo T, Oliveira R, Scapulatempo-Neto C, Vieira RA, Marques MMC. Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. **Oncol Lett.**, v.13, p.4708-4712, 2017. doi: 10.3892/ol.2017.6093.

Napolitano DR, Mineo JR, De Souza MA, De Paula JE, Espindola LS, Espindola FS. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **J Ethnopharmacol.**, v.99 ,p.37-41, 2005. doi: 10.1016/j.jep.2005.01.059

Oberlies NH, Burgess JP, Navarro HA, Pinos RE, Fairchild CR, Peterson RW, Soejarto DD, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Wani MC, Wall ME. Novel bioactive clerodane diterpenoids

from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **J Nat Prod.**, v.65, p.95-99, 2002. doi: 10.1021/np010459m

Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MO, Silva CA, Bechara EL, Trevisan MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n.3, p.689-702, 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300013>

OMS/WHO Library Cataloguing in Publication Data. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Genebra, Suíça. 2003.

OMS/WHO Library Cataloguing in Publication Data. WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. Genebra, Suíça. 2004.

OMS/WHO Library Cataloguing in Publication Data. WHO monographs on selected medicinal plants. Genebra, Suíça. 1999 – 2010.

Pierrri EG, Castro RC, Vizioli EO, Ferreira CMR, Cavalheiro AJ, Tininis AG. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Braz J Pharamacogn** v.27, p.495-501, 2017. doi: 10.1016/j.bjp.2016.12.008.

Pinto AZL, De Assis AFS, Pereira AG, Pasa MC. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais comercializadas no mercado do Porto em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Flovet**. n.5, p.51-70, 2013. Disponível em: <<http://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/flovet/article/view/1529>>

Piovezan AP, Batisti AP, Benevides MLACS, Turnes BL, Martins DF, Kanis L, Duarte ECW, Cavalheiro AJ, Bueno PCP, Seed MP, Norling LV, Cooper D, Headland S, Souza PRPS, Perretti M. Hydroalcoholic crude extract of *Casearia sylvestris* Sw. reduces chronic post-ischemic pain by activation of pro-resolving pathways. **J Ethnopharmacol**. v.204, p.179–188, 2017. doi: 10.1016/j.jep.2017.03.059.

Prieto AM, dos Santos AG, Oliveira AP, Cavalheiro AJ, Silva DH, Bolzani VS, Varanda EA, Soares CP. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene

extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Food Chem Toxicol.** v.53, p.153-159, 2013. doi: 10.1016/j.fct.2012.11.029

Prieto AM, dos Santos AG, Oliveira AP, Cavalheiro AJ, Silva DH, Bolzani VS, Varanda EA, Soares CP Chemopreventive activity of compounds extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae) Sw against DNA damage induced by particulate matter emitted by sugarcane burning near Araraquara, Brazil. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.265, p. 368-372, 2012. doi: 10.1016/j.taap.2012.09.005

Ramos DF, Leitão GG, Costa FDN, Abreu L, Villarreal JV, Leitão SG. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Rev Bras Cienc Farm.**, v.44, p.669-674, 2008. doi: 10.1590/S1516-93322008000400013.

Resende FA, de Oliveira AP, de Camargo MS, Vilegas W, Varanda EA. Evaluation of estrogenic potential of flavonoids using a recombinant yeast strain and MCF7/BUS cell proliferation assay. **PLoS One.** v.8, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0074881.

Santos AG. Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 361 p., 2008. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/105832?show=full>>

Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nat Rev Cancer.** v.6, p.813-23, 2006. doi: 10.1038/nrc1951

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics. CA: **Cancer J Clin.** V.66, p.7-30, 2016. doi: 10.3322/caac.21332.

Simões CMO, Spitzer V. Óleos voláteis. In: Simões CMO *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: UFRGS, 1999. Cap.18, p.387-416.

Singleton VL, Rossi JAJ. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents Am. **J. Enol. Vitic.**, v.16, p.144-158, 1965. Disponível em:< <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>>

Slomp L, Pereira PS, França SC, Zingaretti S, Beleboni RO. In vitro nematocidal effects of medicinal plants from são paulo state, brazil. **Pharm Biol.**, v.47, p.230-235, 2009. doi: 10.1080/13880200802434658.

Soares LP, Gaspi FOG, Ruiz ALTG. Avaliação da atividade antiproliferativa de extratos vegetais de valor etnofarmacológico. Pôster apresentado no **XXV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil** de 06 a 09 de Setembro de 2018. São Paulo, SP – Brasil.

Song Y, Sun H, Zhang A, Yan G, Han Y, Wang X. Plant-derived natural products as leads to anticancer drugs. **Journal of Medicinal Plant and Herbal Therapy Research.** v.2, p.6-15, 2014. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/b5c6/a4d542d4c1508e2cbfea9eb1c6bdd126c2c7.pdf> >

Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The *E-SCREEN* assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. **Environ Health Perspect.**, v.7 p.113-22, 1995. doi: 10.1289/ehp.95103s7113.

Spósito L, Oda FB, Vieira JH, Carvalho FA, Dos Santos Ramos MA, de Castro RC, Crevelin EJ, Crotti AEM, Santos AG, da Silva PB, Chorilli M, Bauab TM. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Casearia sylvestris* leaf derivatives. **J Ethnopharmacol.**, v.233, p.1-12, 2019. doi: 10.1016/j.jep.2018.12.032.

Süntar, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochem Rev.** 2019. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09629-9>.

Swartz. M. HPLC detectors: a brief review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.33, p.1130-1150, 2010. doi: 10.1080/10826076.2010.484356

Tavares WLF, Apolônio ACM, Gomes RT, Teixeira KIR, Brandão MGL, Santos VR. Assessment of the antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* extract against oral pathogenic microorganisms. **Rev Cienc Farm Basica Apl.**, v.29, p.257-260, 2008. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewArticle/592>

Tininis AG, Assonuma MM, Telascree M, Perez CC, Silva MRSRM, Favoreto R, Cavalheiro AJ. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p.132-136, 2006. Disponível em: <http://www.sbpmed.org.br/download/issn_06_3/artigo26_v8_n4.pdf>

Vendruscolo GS, Simões CMO. Etnobotânica no Rio Grande do Sul: análise comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. **São Leopoldo: In Instituto Anchieta de Pesquisas: Pesquisas Botânicas**, n.56, p.285-322, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000534&pid=S0102-3306200900020003100223&lng=pt>

Wagner H, Bladt S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 1984.

Wang W, Zhao J, Wang YH, Smillie TA, Li XC, Khan IA. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Med.**, v.75, p.1436-41, 2009. doi: 10.1055/s-0029-1185726.

Werner AC, Ferraz MC, Yoshida EH, Tribuiani N, Gautuz JA, Santana MN, Dezzotti BA, de Miranda VG, Foramiglio AL, Rostelato-Ferreira S, Tavares RV, Hyslop S, Oshima-Franco Y. The facilitatory effect of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga) fractions on the contractile activity of mammalian and avian neuromuscular apparatus. **Curr Pharm Biotechnol.**, v.16, p.468-81, 2015. doi: 10.2174/1389201016666150303160625.

Xia L, Guo Q, Tu P. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview **Phytochem Rev.**, v.14, 99p., 2015. doi: 10.1007/s11101-014-9336-6.

Yazbek PB, Tezoto J, Cassas F, Rodrigues E. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. **J Ethnopharmacol**, v.179, p.310–331, 2016. doi: 10.1016/j.jep.2015.12.054

Yoshida EH, Tribuiani N, Foramiglio AL, Foramiglio CA, da Silva Tavares RV, Bonomini TJ, Bueno PCP, Cavalheiro AJ, Hyslop S, Puebla P, Feliciano AS, Oshima-Franco Y. A Highly Polar Phytocomplex Involving Rutin is Responsible for the Neuromuscular

Facilitation Caused by *Casearia sylvestris* (guaçatonga). **Curr Pharm Biotechnol.**, v.17, p.1360-1368, 2016. doi: 10.2174/1389201017666161117145947.

ANEXOS

Anexo 1 – Análise de plágio – Turnitin

dissertacao

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

11 %	12 %	4 %	1 %
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	8 %
2	repositorio.unesp.br Fonte da Internet	2 %
3	link.springer.com Fonte da Internet	1 %
4	Sabrina M. Ribeiro, Érick D. O. Fratucelli, Paula C. P. Bueno, Marlene Kelly V. de Castro et al. "Antimicrobial and antibiofilm activities of Casearia sylvestris extracts from distinct Brazilian biomes against Streptococcus mutans and Candida albicans", BMC Complementary and Alternative Medicine, 2019 Publicação	1 %

Excluir citações

Desligado

Excluir correspondências < 1%

Excluir bibliografia

Desligado

Anexo 2 – Cadastro no SisGen



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AF16D29

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

Número do cadastro: **AF16D29**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Casearia sylvestris
Casearia sylvestris - folhas

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Avaliação das atividades anticâncer e estrogênica/antiestrogênica de *Casearia sylvestris***

Equipe

Ana Lucia Tasca Gois Ruiz	UNICAMP
Lana Pereira Soares	Unicamp
Mary Ann Foglio	Unicamp

Data do Cadastro: **22/10/2018 11:44:21**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:44** de **22/10/2018**.



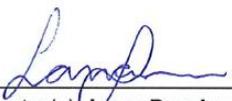
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo 3 – Declaração de direito autoral

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Comparação do perfil químico e da atividade antiproliferativa de extratos das folhas de Casearia sylvestris Sw. (Salicaceae) obtidas de diferentes procedências**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20 de Janeiro de 2020

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Lana Pereira Soares**
RG n.º 45.407.160-7

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Ana Lucia Tasca Gois Ruiz**
RG n.º 21339815-1