



**Universidade Federal do Maranhão**

**Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa, Pós-  
Graduação e Internacionalização**

**Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto**

**Mestrado Acadêmico**



**EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Euterpe oleracea* E  
*Geissospermum vellosii* EM LINHAGENS CELULARES DE  
CÂNCER CERVICAL**

**Vicktor Bruno Pereira Pinto**

**São Luís**

**2023**

**VICKTOR BRUNO PEREIRA PINTO**

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Euterpe oleracea* E  
*Geissospermum vellosii* EM LINHAGENS CELULARES DE  
CÂNCER CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: HPV e Câncer

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Josélia Alencar Lima

Coordenador: Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade

São Luís

2023

Pinto, Vicktor Bruno Pereira.

Efeitos dos extratos de Euterpe oleracea e Geissospermum vellosii em linhagens celulares de câncer cervical / Vicktor Bruno Pereira Pinto. - 2023. 81 p.

Coorientador(a): Josélia Alencar Lima.

Orientador(a): Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

1. Agentes antineoplásicos. 2. Alcaloides. 3. Câncer cervical. 4. Papilomavírus humano. 5. Polifenóis. I. Alencar Lima, Josélia. II. Soares Brandão Nascimento, Maria do Desterro. III. Título.

**Vicktor Bruno Pereira Pinto**

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Euterpe oleracea* E  
*Geissospermum vellosii* EM LINHAGENS CELULARES DE  
CÂNCER CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para a obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto

A Banca Examinadora da Defesa da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: 27 / 02 / 2023.

---

Prof. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento  
(Orientadora) Universidade Federal do Maranhão / PPGSAD

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Custódio Neto da Silva (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão / CCSST – Imperatriz

---

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão / PPGSAD

---

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão / PPGSAD

---

Prof. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes (Suplente)  
Universidade Federal do Maranhão / PPGSAD

## DEDICATÓRIA

*A meus pais e irmã, de quem primeiro recebi incentivos para estudar e buscar sempre mais conhecimento a cada dia.*

*A minhas avós Terezinha Bitencourt e Zelira Júlia (in memoriam), que sempre acreditaram em mim além de minhas capacidades e que teriam orgulho por mais esta etapa concluída.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me criou e redimiou, e à Igreja Católica Apostólica Romana, que me comunicou a Boa Nova e forneceu importantes alicerces para o desenvolvimento das universidades e da cultura ocidental.

À minha mãe, Beatriz, pelo amor inestimável e incansável e pela fé depositada em mim. A meu pai, Sérgio Bitencourt, herói que me tem como herói e que sempre acreditou mais em mim do que eu mesmo. À minha irmã, Ingrid Stephany, que nunca hesitou nos esforços para ensinar e aprender comigo, mostrando o conhecimento como um fluxo constante para edificação.

A meus amigos, que a vida tornou irmãos, sempre dispostos a crescer, sorrir e partilhar comigo. Elaine, Katy, Suanne, Thiago, Vanessa, Betânia e Almir, além do meu amor por vocês, os tenho como espelho, que me ensina quem quero ser e onde quero chegar. Ao Pedro Ivo, com quem aprendi sobre paciência, caráter, necessidade de autocontrole, desafiar-se a si próprio e questionar constantemente o que realmente é certo; você terá sempre meu amor e admiração.

Às minhas orientadoras, prof. Maria do Desterro e prof. Josélia, pela oportunidade e persistência em me ensinar, desafiar constantemente e desejar fazer de mim um autêntico pesquisador, tentando obter o melhor de mim e de minhas pesquisas.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial Lila, Andressa, Rafa, Monique... além de ter aprendido muito com vocês e dever MUITO de cada experimento feito nesta dissertação, muitos dias se tornaram mais leves e divertidos por estar com vocês; obrigado por estes dois anos de parceria.

A todos os demais que contribuíram para a execução desta pesquisa, de maneira especial o prof. Marcelo Andrade, coordenador deste Programa de Pós-Graduação onde tanto aprendi; prof. Socorro Cartágenes que, nas disciplinas de Seminários, me desafiou e tentou lapidar ao máximo minha pesquisa; prof. Cláudia Quintino e Aldilene, responsáveis pelas análises químicas; Marcos Custódio, sempre disposto a partilhar conhecimento, tirar minhas infinitas dúvidas e ajudar no constante planejamento e execução das etapas desta pesquisa; Diamantino, pela

disponibilidade em ensinar o processamento dos extratos; Kátia Borges, de disponibilidade invejável para ajudar todos que lhe pedissem ajuda; ao André, pela serenidade e maestria com que realizou os testes de morte celular e manuseio do citômetro; a Sulayne, Danrley e Ana, do LIAC, pela paciência infinita em “dar uma olhadinha” e ajudar na execução dos experimentos. A todos os professores e colaboradores deste Programa, pela vontade de ensinar e oferecer o máximo de suas capacidades. Vocês são a base de tudo o que foi construído!

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e à Universidade Federal do Maranhão, que viabilizaram esta formação. À FAPEMA, pelo auxílio financeiro para execução desta pesquisa.

*“Nada te perturbe, nada te espante,  
Tudo passa, Deus não muda,  
A paciência tudo alcança...”*

*(Santa Teresa D'Ávila)*

*“Misericordias Domini in æternum cantabo”  
(Cantarei eternamente as misericórdias do Senhor)*

*(Salmo 88)*

## RESUMO

O câncer cervical é um importante problema de saúde pública, sendo a quarta causa de óbito em mulheres no Brasil e terceiro tumor mais comum no estado do Maranhão, tendo opções terapêuticas de eficácia limitada e com efeitos colaterais significativos. *Euterpe oleracea* e *Geissospermum vellosii* são espécies vegetais encontradas na Amazônia maranhense, ricas, respectivamente, em polifenóis e alcaloides indólicos, classes de compostos com reconhecidas atividades antineoplásicas. A semente de açaí corresponde à maior parte do fruto e representa um produto de descarte, com impacto ambiental significativo. Além disso, estudos prévios evidenciam efeito antitumoral dos componentes da semente, superior às demais partes do fruto. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos antitumorais dos extratos de semente de *E. oleracea* e casca de caule de *G. vellosii* em linhagens celulares de câncer cervical. O extrato hidroalcoólico da semente de *E. oleracea* foi preparado a partir dos frutos coletados nos municípios de Axixá, Morros, São Luís e Presidente Juscelino. Após remoção da polpa, trituração das sementes e percolação hidroalcoólica, foi realizada rotavaporação e liofilização. A caracterização química foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência, seguida por espectrometria de massas. Testou-se também o extrato etanólico de casca de caule de *G. vellosii* previamente preparado e caracterizado quimicamente. Os extratos foram testados em linhagens celulares de câncer cervical (HeLa e SiHa) e de fibroblasto pulmonar humano normal (GM), a fim de observar as alterações na viabilidade e morfologia celulares e compará-las aos efeitos provocados pela gencitabina. Através da caracterização química, verificou-se que o extrato de semente de *E. oleracea* contém catequinas e procianidinas como seus componentes predominantes. Esse extrato mostrou redução na viabilidade celular de SiHa e HeLa na concentração 120µg/ml, além de induzir alterações morfológicas discretas. O extrato de *G. vellosii* mostrou grande potencial em reduzir a viabilidade celular de maneira tempo e concentração dependente em todas as linhagens celulares, com IC<sub>50</sub> de 25.46 ± 2.18 e 53.08 ± 2.45 µg/mL para HeLa e SiHa, respectivamente. A morfologia de dessas células foi significativamente afetada pela presença do extrato, com redução da área celular. O extrato de casca do caule de *G. vellosii* evidenciou potencial antineoplásico mais promissor, com maior citotoxicidade e maior sensibilidade da linhagem tumoral

relacionada ao HPV-18 (HeLa) a baixas concentrações, quando comparada a linhagem de células normais. Além disso, foi capaz de reduzir significativamente a formação de colônias de células tumorais após o tratamento. Verificou-se ainda efeito antitumoral favorável na associação dos extratos de *E. oleracea* e *G. vellosoi* entre si e com a gencitabina, com aumento da citotoxicidade em células tumorais, sem reduzir significativamente a viabilidade das células normais testadas. Uma das principais inovações deste trabalho é o potencial dos extratos como adjuvantes no tratamento antineoplásico.

**Palavras-chave:** Câncer cervical; Papilomavírus humano; Polifenóis; Alcaloides; Agentes antineoplásicos.

## ABSTRACT

Cervical cancer is an important public health problem, being the fourth cause of death in women in Brazil and the third most common tumor in the state of Maranhão, with therapeutic options of limited effectiveness and with significant side effects. *Euterpe oleracea* and *Geissospermum vellosii* are plant species found in the Maranhão Amazon, rich, respectively, in polyphenols and indole alkaloids, classes of compounds with recognized antineoplastic activities. The açai seed corresponds to most of the fruit and represents a waste product, with a significant environmental impact. In addition, previous studies show an antitumor effect of the components of the seed, superior to the other parts of the fruit. This work aimed to evaluate the antitumor effects of *E. oleracea* seed and *G. vellosii* stem bark extracts on cervical cancer cell lines. The hydroalcoholic extract of the seed of *E. oleracea* was prepared from the fruits collected in the municipalities of Axixá, Morros, São Luís and Presidente Juscelino. After removing the pulp, crushing the seeds and hydroalcoholic percolation, rotavaporation and lyophilization were performed. Chemical characterization was performed by high performance liquid chromatography, followed by mass spectrometry. The ethanolic extract of the stem bark of *G. vellosii* previously prepared and chemically characterized was also tested. The extracts were tested on cervical cancer cell lines (HeLa and SiHa) and normal human lung fibroblast (GM) in order to observe changes in cell viability and morphology and compare them to the effects caused by gemcitabine. Through chemical characterization, it was found that *E. oleracea* seed extract contains catechins and procyanidins as its predominant components. This extract showed a reduction in cell viability of SiHa and HeLa at a concentration of 120µg/ml, in addition to inducing discrete morphological changes. The *G. vellosii* extract showed great potential to reduce cell viability in a time and concentration dependent manner in all cell lines, with IC<sub>50</sub> of 25.46 ± 2.18 and 53.08 ± 2.45 µg/mL for HeLa and SiHa, respectively. The morphology of these cells was significantly affected by the presence of the extract, with a reduction in cell area. The stem bark extract of *G. vellosii* showed more promising antineoplastic potential, with greater cytotoxicity and greater sensitivity of the tumor lineage related to HPV-18 (HeLa) at low concentrations, when compared to the normal cell line. Furthermore, it was able to significantly reduce the formation of tumor cell colonies after treatment. There was also a favorable antitumor effect in the

association of extracts of *E. oleracea* and *G. vellosii* among themselves and with gemcitabine, with increased cytotoxicity in tumor cells, without significantly reducing the viability of normal cells tested. One of the main innovations of this work is the potential of extracts as adjuvants in antineoplastic treatment.

**Key-words:** Cervical cancer; Human papillomavirus; Polyphenols; Alkaloids; Antineoplastic Agents.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Distribuição dos casos e mortes dos dez cânceres mais comuns em 2020 em ambos os sexos	<b>Pág. 20</b>
<b>Figura 2</b>	Representação do procedimento de traquelectomia	<b>Pág. 23</b>
<b>Figura 3</b>	Flavonoides e antocianinas presentes nos extratos de <i>E. oleracea</i> .	<b>Pág. 27</b>
<b>Figura 4</b>	Alcaloides do <i>Geissospermum vellosii</i>	<b>Pág. 29</b>
<b>Figura 5</b>	Municípios maranhenses em que se deu a coleta dos frutos de açaí para preparo dos extratos.	<b>Pág. 31</b>
<b>Figura 6</b>	Registro do aspecto do extrato obtido por percolação, do 1º ao 21º dia	<b>Pág. 32</b>
<b>Figura 7</b>	Aspecto final do extrato hidroalcoólico de <i>E. oleracea</i> após liofilização.	<b>Pág. 33</b>
<b>Figura 8</b>	Cromatogramas dos extratos de semente de <i>E. oleracea</i> dos quatro municípios maranhenses.	<b>Pág. 39</b>
<b>Figura 9</b>	Espectro de massas do extrato de semente de açaí procedente do município de São Luís	<b>Pág. 40</b>
<b>Figura 10</b>	Espectro de massas do extrato de semente de açaí procedente do município de Presidente Juscelino	<b>Pág. 41</b>
<b>Figura 11</b>	Viabilidade celular após o tratamento com extrato de semente de <i>Euterpe oleracea</i>	<b>Pág. 42</b>
<b>Figura 12</b>	Viabilidade celular após o tratamento com extrato de <i>Geissospermum vellosii</i>	<b>Pág. 44</b>
<b>Figura 13</b>	Curva dose-resposta e determinação da concentração inibitória média do <i>G. vellosii</i>	<b>Pág. 45</b>
<b>Figura 14</b>	Curva dose-resposta e determinação da concentração inibitória média da gencitabina em GM	<b>Pág. 45</b>
<b>Figura 15</b>	Viabilidade celular após o tratamento com gencitabina	<b>Pág. 46</b>
<b>Figura 16</b>	Viabilidade celular após o tratamento com blenda GCTB + EOSL	<b>Pág. 48</b>
<b>Figura 17</b>	Viabilidade celular após o tratamento com blenda GCTB + PP	<b>Pág. 49</b>
<b>Figura 18</b>	Viabilidade celular após o tratamento com blenda EOSL + PP	<b>Pág. 50</b>
<b>Figura 19</b>	Imagens de microscopia óptica da linhagem HeLa	<b>Pág. 53</b>
<b>Figura 20</b>	Imagens de microscopia óptica da linhagem SiHa	<b>Pág. 54</b>
<b>Figura 21</b>	Ensaio clonogênico na linhagem SiHa	<b>Pág. 55</b>
<b>Figura 22</b>	Gráfico dos eventos de apoptose inicial e tardia para cada uma das soluções testadas em SiHa	<b>Pág. 56</b>
<b>Figura 23</b>	Imagens de citometria de fluxo no ensaio de Anexina V na linhagem SiHa	<b>Pág. 57</b>

- Figura 24** Gráfico dos eventos de apoptose inicial e tardia para cada uma das soluções testadas em HeLa **Pág. 58**
- Figura 25** Imagens de citometria de fluxo no ensaio de Anexina V na linhagem HeLa **Pág. 59**
- Figura 26** Mediação regulada por nAChR de diversos eventos tumorigênicos **Pág 67**

## LISTA DE TABELAS

- |                 |   |                |
|-----------------|---|----------------|
| <b>Tabela 1</b> | Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.   | <b>Pág. 21</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Ocorrência e papel das principais classes de fitoquímicos   | <b>Pág. 25</b> |
| <b>Tabela 3</b> | Identificação dos compostos representados pelos picos do espectro de massas do extrato de sementes de <i>Euterpe oleracea</i> provenientes do município de São Luís (MA).             | <b>Pág. 40</b> |
| <b>Tabela 4</b> | Identificação dos compostos representados pelos picos do espectro de massas do extrato de sementes de <i>Euterpe oleracea</i> provenientes do município de Presidente Juscelino (MA). | <b>Pág. 41</b> |
| <b>Tabela 5</b> | Medidas de morfologia das células após o tratamento com os compostos  | <b>Pág. 51</b> |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>CaC</b>	Câncer cervical ou de colo de útero
<b>DMEM</b>	Meio de cultura Dulbecco's modificado
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EOJ</b>	Extrato hidroalcolico da semente de <i>Euterpe oleracea</i> proveniente do município de Presidente Juscelino-Ma
<b>EOSL</b>	Extrato hidroalcolico da semente de <i>Euterpe oleracea</i> proveniente do município de São Luís-Ma.
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>GCTB</b>	Gencitabina
<b>GM</b>	Linhagem celular de fibroblasto pulmonar humano
<b>HeLa</b>	Linhagem celular de câncer cervical relacionado ao HPV 18
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alto desempenho
<b>HPV</b>	Papilomavírus humano
<b>LQPN</b>	Laboratório de Química de Produtos Naturais
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>nACh</b>	Receptor nicotínico da acetilcolina
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PP</b>	Extrato etanólico de caule do <i>Geissospermum vellosii</i>
<b>QT</b>	Quimioterapia
<b>RT</b>	Radioterapia
<b>SiHa</b>	Linhagem celular de câncer cervical relacionado ao HPV 16
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de necrose tumoral beta
<b>UFMA</b>	Universidade Federal do Maranhão
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
3.1. Neoplasia de colo de útero .....	20
3.1.1. Epidemiologia do câncer cervical .....	20
3.1.2. Fatores de risco e prevenção do câncer cervical .....	21
3.1.3. Métodos diagnósticos .....	22
3.1.4. Tratamento e seguimento .....	22
3.2. Produtos Naturais como agentes terapêuticos para o câncer .....	25
3.2.1. <i>Euterpe oleracea</i> .....	26
3.2.2. <i>Geissospermum vellosii</i> .....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1. Preparo e caracterização do extrato hidroalcoólico de semente de <i>E. oleracea</i> .....	31
4.1.1. Coleta e acondicionamento dos frutos .....	31
4.1.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>E. oleracea</i> .....	31
4.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência .....	33
4.1.4. Espectrometria de massas .....	34
4.2. Extrato de <i>Geissospermum vellosii</i> .....	34
4.3. Aspectos éticos .....	35
4.4. Linhagens celulares .....	35
4.4.1. Linhagens e condições de cultivo .....	35
4.4.2. Preparo das soluções .....	35
4.4.3. Ensaio de viabilidade celular .....	36
4.4.4. Morfologia celular .....	36
4.4.5. Ensaio de formação de colônias .....	37
4.4.6. Ensaio de morte celular .....	38
4.5. Análise estatística .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1. Caracterização química dos extratos hidroalcoólicos de sementes de <i>E. oleracea</i> .....	39
5.1.1. Análise dos extratos hidroalcoólicos das sementes de açaí procedentes dos municípios de São Luís, Axixá e Morros .....	39
5.1.2. Análise dos extratos hidroalcoólicos das sementes de açaí procedentes do município de Presidente Juscelino .....	40
5.2. Efeitos dos extratos na viabilidade celular .....	42
5.2.1. Citotoxicidade do extrato de semente de <i>E. oleracea</i> .....	42
5.2.2. Citotoxicidade do extrato de <i>G. vellosii</i> .....	43

5.2.3. Citotoxicidade da gencitabina .....	45
5.2.4. Citotoxicidade da blenda da gencitabina com o extrato de semente de <i>E. oleracea</i> .....	47
5.2.5. Citotoxicidade da blenda da gencitabina com o extrato de casca de caule de <i>G. vellosii</i> .....	48
5.2.6. Citotoxicidade da blenda entre os extratos de semente de <i>E. oleracea</i> e casca de caule de <i>G. vellosii</i> .....	50
5.3. Efeitos dos extratos na morfologia celular .....	51
5.3.1. Alterações morfológicas após tratamento com o extrato de semente de <i>E. oleracea</i> .....	52
5.3.2. Alterações morfológicas após tratamento com o extrato de <i>G. vellosii</i> .....	52
5.3.3. Alterações morfológicas após tratamento com gencitabina .....	52
5.4. Efeitos dos extratos na formação de colônias .....	55
5.5. Mecanismos de morte celular dos extratos .....	56
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico para definir distúrbios caracterizados pelo crescimento descontrolado de células malignas, com potencial para invadir tecidos e órgãos vizinhos e levar a metástases (OPAS, 2018; Sung *et al*, 2021). Os cânceres causam uma em cada seis mortes mundialmente, mais que AIDS, tuberculose e malária juntos (American Cancer Society, 2018). Representam o principal problema de saúde pública no mundo, sendo esperado que se tornem a principal causa de óbito e maior barreira para aumento da expectativa de vida em todos os países (Bray *et al*, 2018; Sung *et al*, 2021; Siegel, Miller, Wagle, 2023).

O câncer de colo de útero, também chamado de câncer cervical (CaC), é um importante problema de saúde pública, sendo a terceira neoplasia mais frequente e quarta causa de óbito em mulheres no Brasil. Tem estimativa de 17.010 casos novos para o triênio de 2023 a 2025, correspondendo a 15,38 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2022). O Maranhão é o segundo estado da Federação com maior número de casos de câncer cervical, com estimativa de 800 casos novos para o ano de 2023 (21,13 casos para cada 100 000 habitantes) (INCA, 2022).

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV), sintomática ou assintomática é considerada causa necessária para o CaC (Wild, Weiderpass, Stewart, 2020; Okunade, 2021). A incidência desse câncer está relacionada à exposição aos fatores de risco, eficiência dos programas de rastreamento e, mais recentemente, cobertura vacinal contra o HPV (Feitosa, Almeida, 2007; Lei *et al*, 2020).

As principais modalidades terapêuticas para essa neoplasia são histerectomia radical do tumor, quimioterapia contendo cisplatina ou carboplatina, braquiterapia da cavidade uterina ou radioterapia de intensidade modulada, usadas dependendo do estadiamento do tumor (Koh *et al*, 2019). Todas essas modalidades têm eficácia limitada e efeitos colaterais significativos, como menopausa precoce, infertilidade, redução do prazer sexual, linfedema, neuropatia periférica e complicações específicas, dependendo da modalidade empregada (Nunes de Arruda *et al*, 2020).

A grande diversidade vegetal do Brasil representa importante potencial farmacológico, uma vez que as plantas possuem compostos com propriedades bioativas que podem ser usadas como medicamentos (Godswill, 2019). Os

fitoquímicos são compostos presentes nos alimentos derivados de plantas, com atividades antioxidante, antiproliferativa, antiangiogênica e antiestrogênica, podendo bloquear ou reverter etapas da carcinogênese (Seeram, 2008; Koche, Shirsat, Kawale, 2016).

*Euterpe oleracea* e *Geissospermum vellosii* são espécies brasileiras, encontradas na Amazônia maranhense, que vêm despertando interesse científico na pesquisa de tratamentos antineoplásicos (Silva *et al*, 2014; Alessandra-Perini, 2018; Silva *et al*, 2021; Silva *et al*, 2022; Li *et al*, 2019). A *E. oleracea* é rica em polifenóis e o *G. vellosii*, em alcaloides indólicos, classes de compostos com reconhecidas atividades antineoplásicas (Silva *et al*, 2021; Lima *et al*, 2009; Lima *et al*, 2016; Lima *et al*, 2020; Li *et al*, 2019).

Diante do conhecimento acerca dos fitoquímicos presentes na *E. oleracea* e no *G. vellosii* e suas potenciais propriedades antitumorais, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos extratos dessas plantas sobre linhagens celulares de câncer cervical relacionadas ao HPV e compará-los aos efeitos em células normais, bem como com os efeitos da gencitabina, um quimioterápico já utilizado clinicamente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral:

Avaliar os efeitos antitumorais dos extratos de semente de *Euterpe oleracea* e casca de caule de *Geissospermum vellosii* em linhagens celulares de câncer cervical (HeLa e SiHa).

### 2.2. Objetivos específicos:

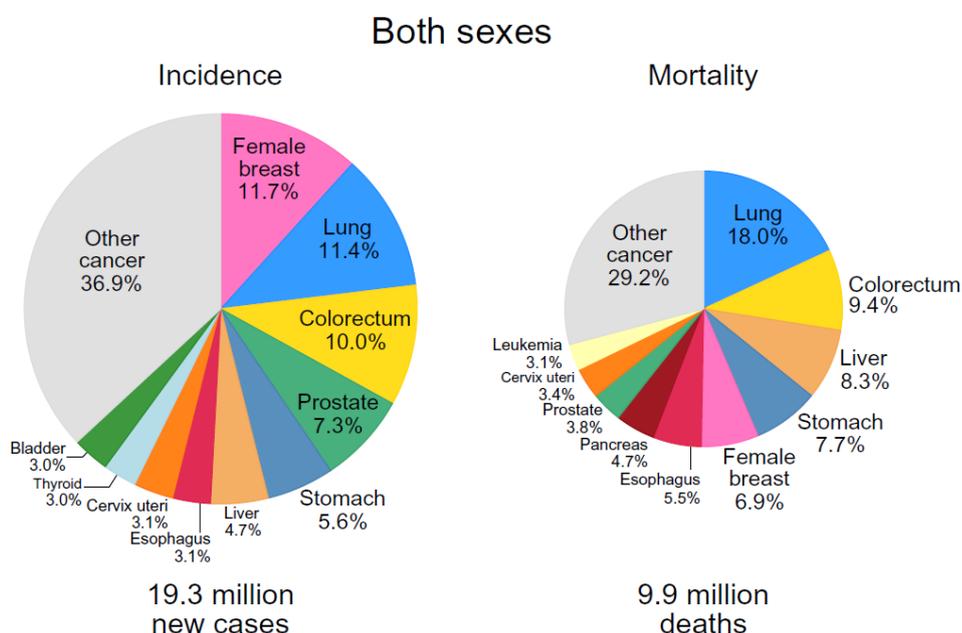
- Obter e caracterizar quimicamente os extratos hidroalcoólicos de sementes de açaí procedentes dos municípios maranhenses de São Luís, Axixá, Morros e Presidente Juscelino;
- Analisar a viabilidade, morfologia e mecanismos de morte celular das linhagens celulares após tratamento com os extratos da semente *E. oleracea* e casca de caule de *G. vellosii* em diferentes concentrações;
- Comparar os efeitos dos extratos e da gencitabina – quimioterápico de uso clínico – em células tumorais de câncer cervical e normais de fibroblasto de pulmão;
- Avaliar os efeitos de combinações dos extratos à gencitabina e entre si.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Neoplasia de colo de útero

##### 3.1.1. Epidemiologia do câncer cervical

Em 2020 foram diagnosticados aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo, com mortalidade global de 10 milhões (Sung *et al*, 2021). A incidência do câncer vem aumentando globalmente, associada ao envelhecimento, crescimento populacional e prevalência dos fatores de risco, especialmente dos casos associados ao desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2022).



**Figura 1:** Distribuição dos casos e mortes dos dez cânceres mais comuns em 2020 em ambos os sexos.

**Extraída de:** GLOBOCAN, 2020.

Os cânceres mais incidentes no mundo são, respectivamente, de mama feminino, pulmão, próstata, pele não melanoma e colorretal (**Figura 1**) (Sung *et al*, 2021; Siegel, Miller, Wagle, 2023). No Brasil os mais incidentes são: mama feminina, próstata, colorretal e pulmão. O câncer de colo de útero é o terceiro mais comum em mulheres, representando 7,4% dos casos novos de neoplasia no país (INCA, 2019).

O câncer cervical ocorre predominantemente em países em desenvolvimento, com falta de recursos (Cohen *et al*, 2019). No Brasil, ocupa lugar de destaque nas regiões Norte e Nordeste, onde é a segunda neoplasia mais incidente, havendo equivalência entre os casos novos de neoplasia cervical e mama na região Norte (INCA, 2019; INCA, 2022). No estado do Maranhão também é o terceiro câncer mais comum, sendo estimados 800 casos novos para o ano de 2023 (INCA, 2022).

	Localização Primária	Casos	%
 Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
	Cólon e reto	23.660	9,7%
	Colo do útero	17.010	7,0%
	Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
	Glândula tireoide	14.160	5,8%
	Estômago	8.140	3,3%
	Corpo do útero	7.840	3,2%
	Ovário	7.310	3,0%
	Pâncreas	5.690	2,3%
	Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

**Tabela 1:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.

**Extraída de:** Estimativa 2023, INCA.

### 3.1.2. Fatores de risco e prevenção do câncer cervical

O principal fator de risco, considerado essencial para o desenvolvimento dessa neoplasia, é a infecção por alguns tipos de papilomavírus humanos (Schiffman *et al*, 2016; Wild, Weiderpass, Stewart, 2020). Essas infecções levam a alterações no epitélio da cérvix uterina, que podem evoluir para câncer (INCA, 2019). Entretanto, cerca de 5% desses cânceres não estão relacionados ao HPV, especialmente adenocarcinomas (Cancer Genome, 2017). Os HPV 16 e 18 são considerados os de maior oncogenicidade (Zeferino *et al*, 2018).

Outros fatores de risco para essa neoplasia são início precoce da vida sexual, promiscuidade, história de infecções sexualmente transmissíveis, tabagismo, uso prolongado de anticoncepcionais, obesidade, desnutrição e imunossupressão (INCA, 2019; Momenimovahed, Salehiniya, 2017). Cita-se ainda o número de gestações completas como fator de risco independente para o HPV e câncer cervical (Okunade, 2021).

A prevenção do CaC está relacionada à redução do contágio por HPV, como redução das parcerias sexuais e uso de preservativo (INCA, 2019). Além disso, é recomendada a realização do exame citopatológico de colo uterino (Papanicolaou) para as mulheres em idade sexual, conforme preconizado pela OMS (Feitosa, Almeida, 2007). Outro recurso com importante papel na prevenção dessa neoplasia é a vacinação em massa, antes do início da vida sexual, capaz de reduzir substancialmente o risco de apresentações invasivas (Lei *et al*, 2020).

### **3.1.3. Métodos diagnósticos**

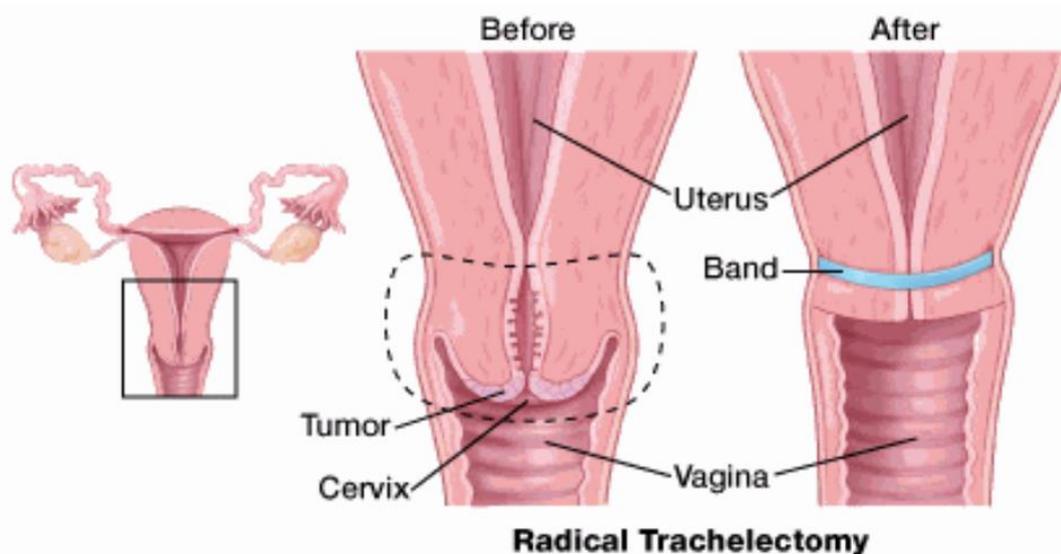
A abordagem das pacientes deve ter início com a sua história clínica e sexual. Nos estágios mais precoces, a doença costuma ser assintomática, mas nos estágios avançados, as pacientes podem apresentar sangramento intermenstrual e/ou associado ao coito, edema de membros, dor em flancos ou ciática (Cohen *et al*, 2019). O ponto-chave para diagnóstico é a identificação das lesões cervicais escamosas precursoras, através do exame citológico, coletado através de exame especular, indicado para mulheres entre 25 e 60 anos, após início da atividade sexual (Brasil, 2011).

É possível ainda realizar testes primários para identificação do HPV, os quais têm se tornado mais populares, especialmente em mulheres mais jovens (Rerucha, Caro, Wheeler, 2018; CDC, 2021). Caso o teste seja positivo, pode-se realizar o exame citológico para avaliar a severidade das alterações a nível celular (ACS, 2021). Citologia oncológica anormal ou teste positivo para HPV de alto risco devem conduzir à colposcopia e biópsia ou procedimentos excisionais, como a conização (Marth *et al*, 2017).

### **3.1.4. Tratamento e seguimento**

A indicação da terapia ideal para o câncer cervical deve levar em consideração os dados da biópsia, história clínica da paciente, desejo de ter filhos etc. (FDA, 2022). As opções terapêuticas são, primariamente, através de cirurgia ou radio-quimioterapia (Bhatla *et al*, 2021).

Em estágios mais iniciais, podem-se adotar modalidades cirúrgicas preservadoras de fertilidade, como a conização e a traquelectomia (NCCN, 2019). Na conização retira-se preferencialmente uma peça inteira do colo uterino, com formato de cone; nos estágios iniciais da doença, pode ser considerada curativa (WHO, 2021). Na traquelectomia, por sua vez, remove-se apenas a cérvix uterina, com preservação do corpo uterino (**Figura 2**), podendo ser realizada pelas vias abdominal ou vaginal abertas ou por abordagens minimamente invasivas (NCCN, 2019; Bhatla *et al*, 2021).



**Figura 2:** Representação do procedimento de traquelectomia, por meio do qual é feita a remoção da cérvix uterina.

**Extraída de:** American Cancer Society, 2021.

Em estágios avançados, não é possível a preservação da fertilidade, sendo necessária a realização da histerectomia, que pode ser realizada de maneira “simples” ou extrafascial ou histerectomia radical modificada, com remoção de linfonodos pélvicos, preferencialmente por abordagem aberta (Bhatla *et al*, 2021; NCCN, 2019; Bogani *et al*, 2022). Na histerectomia ampliada, remove-se o útero, terço superior da vagina, paramétrios e parte do paracolpo, juntamente com a dissecação linfonodal (Bhatla *et al*, 2021). A linfadenectomia pélvica deve ser sempre realizada, devido ao risco de envolvimento linfonodal (van Meurs, 2009).

Algumas complicações e efeitos relacionados à terapia cirúrgica do câncer cervical são: sangramentos, lesões dos órgãos adjacentes ao sítio cirúrgico, risco de trombose venosa profunda etc. (Broutet *et al*, 2014; Lee *et al*, 2020).

Além das modalidades cirúrgicas, pode-se optar pela radioterapia (RT) de feixes externos associada à braquiterapia (na qual implantam-se sementes

radioativas). Esse esquema pode ser feito isolado ou associado (quimio-radioterapia) à quimioterapia (QT) baseada em platina (NCCN, 2019). A RT pode induzir menopausa precoce, infertilidade, desconforto e dor no intercursos sexual etc. (Broutet *et al*, 2014; Lee *et al*, 2020).

Embora a base dos esquemas quimioterápicos seja a cisplatina, o uso da droga traz preocupações no que diz respeito a seus extremos efeitos adversos e desenvolvimento de resistência pelo tumor – sendo este último o principal obstáculo para seu uso (Bhatla *et al*, 2021). A cisplatina tem efeito antitumoral por meio da ligação e lesão do material genético celular, evitando o desenvolvimento e proliferação das células cancerígenas; os mecanismos de resistência tumoral à droga são múltiplos, o que dificulta sua resolução (Bhattacharjee, 2022). Algumas estratégias aventadas para suplantam a indução de resistência do quimioterápico são a terapia fotodinâmica, combinação com outras drogas e compostos naturais, entre outras (Galluzzi *et al*, 2012).

Pacientes que não podem receber os esquemas de QT com platina, podem receber esquemas baseados em 5-fluoruracil (Kim *et al*, 2008). Convém lembrar que, além da resistência às drogas, os efeitos adversos da quimioterapia não afetam apenas as células malignas, mas também células de todo o corpo, com alto potencial de replicação (Broutet *et al*, 2014; Lee *et al*, 2020).

O seguimento pós-tratamento deve ser feito inicialmente a cada dois ou três meses e, posteriormente, em intervalos mais longos. Devem ser pesquisadas e tratadas complicações de natureza psicossocial e sinais de recidiva de doença (Bhatla *et al*, 2021).

Tendo em vista as limitações das estratégias terapêuticas atuais do câncer cervical, índice de recidiva, bem como grande perfil de complicações, tem-se buscado descobrir novos potenciais tratamentos para essa neoplasia, a partir de produtos naturais (Park *et al*, 2021). Alguns desses produtos podem ser utilizados isoladamente ou combinados com medicamentos quimioterápicos (Momtazi-Borojeni *et al*, 2018; Nasreen *et al*, 2018). Em uma revisão de literatura realizada por Park e colaboradores (2021), os autores citam ao todo sessenta e quatro produtos naturais com potencial efeito sobre o câncer cervical.

### 3.2. Produtos naturais como agentes terapêuticos para o câncer

Historicamente, os produtos naturais desempenham papel de destaque na descoberta de medicamentos, especialmente para tratamento de infecções e neoplasias (Harvey, Edrada-Ebel, Quinn, 2015). O uso da medicina natural tem aumentado em países desenvolvidos como terapia complementar e chega a 80% no continente africano, que depende primordialmente de plantas para os cuidados primários de saúde (OMS, 2017). Mais de um quarto dos novos fármacos, dentre eles as drogas anticâncer, aprovados entre 1981 e 2019 são derivadas de produtos naturais (Newman, Cragg, 2020).

A utilização desses produtos, especialmente de origem vegetal, tem sido comum com finalidade terapêutica (**Tabela 2**). O uso de chás tem sido associado a vários benefícios à saúde, como prevenção de neoplasias, doenças crônicas e neurodegenerativas, envelhecimento da pele, fraturas etc. (Yang *et al*, 2009). Múltiplos mecanismos de ação têm sido propostos para explicar os efeitos quimiopreventivos desses produtos (Dou, 2019).

**Tabela 2: Ocorrência e papel das principais classes de fitoquímicos**

<b>Classe de fitoquímico</b>	<b>Ocorrência como produto natural (%)</b>	<b>Função na saúde</b>
<b>Fenólicos</b>	45	Antioxidantes, antineoplásicos, citotóxicos, antimicrobianos e vasodilatadores
<b>Terpenoides e esteroides</b>	27	Antimicrobianos, desintoxicantes, fortificantes, antirreumáticos, antimaláricos, Hepatoprotetores
<b>Alcaloides</b>	18	Neurofármacos, antineoplásicos, sedativos, antimicrobianos, inseticidas
<b>Outros químicos</b>	10	Anti-inflamatório, imunoestimulante

**Extraída de:** Koche, Shirsat, Kawale, 2016. *An overview of major classes of phytochemicals: their types and role in disease prevention.*

Embora não haja uma classificação exata para os fitoquímicos, esses compostos são, classicamente, divididos em metabólitos primários (açúcares, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e clorofilas) e metabólitos secundários (fenólicos, terpenoides, esteroides vegetais, alcaloides, etc.) (Koche, Shirsat, Kawale, 2016). Grande parte das substâncias de interesse farmacêutico são provenientes de metabólitos secundários, produzidos pelas plantas para regulação, balanceamento e

adaptação ao ambiente, fatores físicos e químicos e proteção contra patógenos e predadores (Valli, Russo, Bolzani, 2018).

Com o desenvolvimento da indústria farmacêutica e de técnicas mais modernas para síntese laboratorial de compostos bioativos, muitos cientistas têm se referido ao uso de produtos naturais como de mero interesse histórico (Cote *et al*, 2015; Cheng *et al*, 2016). Entretanto, são cada vez mais emergentes os estudos que demonstram efeito sinérgico desses produtos com quimioterápicos modernos, ajudando a reduzir a indução de resistência e intensificando os efeitos dos fármacos antineoplásicos (Cote *et al*, 2015; Pearson *et al*, 2017).

Tendo em vista o grande número de espécies vegetais do planeta e inúmeros padrões capazes de produzir extraordinária diversidade química, a biodiversidade em ambientes tropicais e equatoriais oferece potencial particularmente grande para descoberta de compostos ativos que podem ser usados como modelos na química medicinal e descoberta de fármacos (Bolzani *et al*. 2012). Portanto, é evidente que os produtos naturais continuam a desempenhar um papel altamente significativo no desenvolvimento de novas drogas (Newman, Cragg, 2020).

### **3.2.1. *Euterpe oleracea***

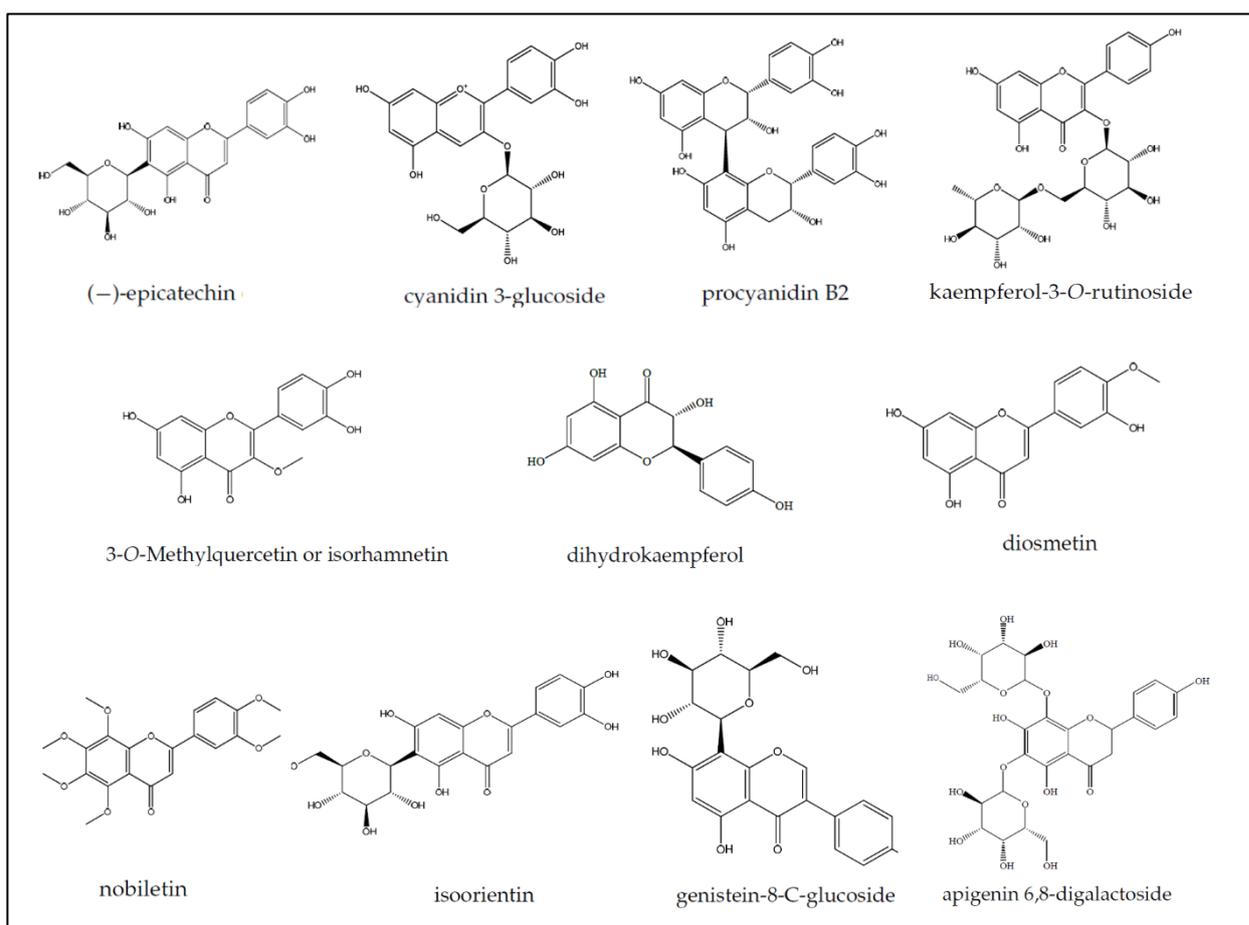
O açaí é um fruto de cor roxa-escura, oriundo do açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), árvore típica da Amazônia Brasileira e um dos mais importantes produtos do extrativismo nacional. O Brasil é um dos grandes produtores de açaí, principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão, Acre, Amapá e Rondônia (CONAB, 2019).

É considerado uma “super fruta”, dado seu elevado valor energético e nutricional, sendo alimento básico na dieta da população ribeirinha do Rio Amazonas (EMBRAPA, 2006). Possui constituintes com importantes propriedades nutricionais e terapêuticas, o que aumenta sua cadeia global de valor, movimentando um mercado global de cifras bastante expressivas (Neves, 2015).

A demanda por açaí tem aumentado nos mercados nacional e internacional, para diferentes consumos, devido principalmente ao seu grande valor nutricional e propriedades medicinais (Rogez, 2000). É considerado um fruto quimiopreventivo, pela sua capacidade de reduzir a formação de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (Kang *et al*, 2011).

O elevado teor de ácidos graxos insaturados torna o fruto atraente para o mercado dos chamados alimentos funcionais – definidos como aqueles que possuem compostos ativos com comprovado benefício na prevenção e tratamento de doenças crônicas (Martirosyan, Singh, 2015). O uso de matérias primas ricas em ácidos graxos mono e poli-insaturados é de grande interesse para as indústrias de alimentos e bebidas que buscam alternativas para a elaboração de produtos mais saudáveis (Nascimento *et al*, 2008).

Destaca-se ainda o elevado teor de polifenóis da classe dos flavonoides, com destaque para as antocianinas (**Figura 3**) (Lima *et al*, 2012). Esses compostos têm propriedades antioxidantes e estão associados à prevenção de doenças crônicas, como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas (Ramos, Herrera, Moya-León, 2014).



**Figura 3:** Flavonoides e antocianinas presentes nos extratos de *E. oleracea*.  
Adaptada de: Silva *et al*, 2021.

Embora o produto final de interesse após o beneficiamento do fruto seja a polpa, esta corresponde a apenas 15% de sua massa total. Os 85% restantes, referentes a caroço e fibras, normalmente são descartados como “rejeito orgânico”,

sem destinação econômica adequada. A polpa de açaí é rica em água (cerca de 85% de sua composição), lipídeos (7,2%) e proteínas (2,8%) (Tinoco, 2005).

Apesar de a semente ser formada predominantemente por ligninas e celulose, substâncias biodegradáveis, os resíduos do açaí representam um importante problema ambiental (Rodrigues *et al.*, 2006). As regiões Norte e Nordeste – de maior produção no Brasil – geram grande quantidade de resíduos, em sua maioria depositados irregularmente no meio ambiente, podendo tornar-se poluentes de mananciais e reduzindo os níveis de oxigênio dissolvido na água, ou em muitas cidades são jogados em vias públicas (Maranho, Paiva, 2012).

Apesar de os chás verde e preto possuírem quantidades maiores de polifenóis que os encontrados no extrato de semente de *E. oleracea*, o maior valor da identificação e potencial isolamento desses compostos está na possibilidade de aproveitamento do caroço – um subproduto, habitualmente descartado – para a obtenção de fármacos bioativos (Khan, Mukhtar, 2007; Maranho, Paiva, 2012). Portanto, o aproveitamento desses resíduos, além de aplicabilidade por seu potencial farmacológico, ajudaria a resolver o problema da quantidade de resíduos lançados no meio (FAO, 2021).

Ainda há poucos estudos avaliando a atividade biológica dos compostos presentes na semente de açaí. Em diferentes modelos animais experimentais *in vivo*, extratos hidroalcoólicos do caroço têm apresentado efeitos anti-hipertensivo, antioxidante, anti-inflamatório, redutor da lipogênese, hipolipidêmico e vasodilatador (Silva *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos têm demonstrado atividades antioxidantes (inibição da peroxidação lipídica e atividade sequestradora relevante contra radicais peroxil, peroxinitrito e hidroxila), reversão do estresse oxidativo induzido por água oxigenada; atividades citotóxicas em linhagens celulares malignas de tumores humanos, como os de mama (MCF-7), pulmão (A549 e NCI-H460), e fígado (HepG2) (Martinez *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2015).

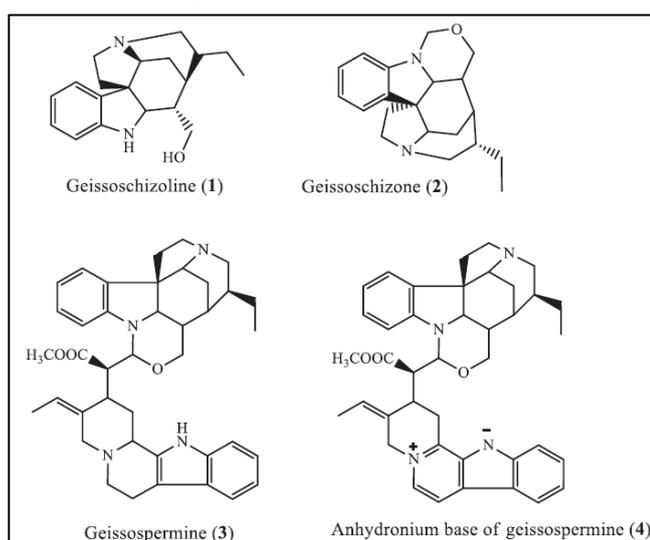
Deste modo, o extrato de semente de *Euterpe oleracea* pode representar um produto natural com atividade promissora contra diversas doenças, além de ajudar a reduzir o impacto ambiental causado pelo descarte inadequado desse produto no meio.

### 3.2.2. *Geissospermum vellosii*

O pau pereira (*Geissospermum vellosii* – também referido na literatura científica como *Geissospermum leave* ou *Tabernaemontana laevis*) é uma árvore encontrada na Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Pio Corrêa, 1984). Sua casca, de sabor amargo, é usada na medicina popular desde os tempos coloniais com diversas finalidades (Almeida *et al*, 2009).

O uso medicinal do *G. vellosii* para tratamento de febres, dores, doenças hepáticas, dispepsia, tonturas, malária, constipação etc. aguçou o interesse científico, de modo que foi a primeira espécie do gênero a ter sua composição química detalhadamente estudada (Camargo *et al*, 2013). As principais formas de uso popular são através de banhos ou chás preparados com as cascas da planta (Almeida *et al*, 2009).

O caule do pau pereira é rico em alcaloides indólicos, com intensa atividade anticolinesterásica (Lima *et al*, 2009; Lima *et al*, 2016). Os alcaloides indólicos são conhecidos por suas atividades farmacológicas, como antimicrobiana e especialmente antitumoral, ocupando lugar de destaque na síntese de fármacos e compostos bioativos (Luo *et al*, 2022). Os principais alcaloides isolados foram geissosquizolina, geissosquizona, geissospermina e 3',4',5',6'-tetrahydrogeissospermina, uma base anidrónio de geissospermina (**Figura 4**) (Lima *et al*, 2009; Lima *et al*, 2016).



**Figura 4:** Alcaloides do *Geissospermum vellosii*.  
Extraída de: Lima *et al*, 2020.

Estudos em modelos animais têm evidenciado melhora de memória, inflamação e dor após o tratamento com o extrato de caule de pau pereira (Lima *et al*, 2009; Lima *et al*, 2016). Os efeitos antineoplásicos de componentes do extrato do caule foram

verificados e caracterizados por variados mecanismos no glioblastoma, câncer colorretal, de pâncreas, de ovários, entre outros (Beljanski *et al*, 1993; Li *et al*, 2019; Dong, Chen, Che, 2018; Chen, Dong, Chen, 2022).

Uma vez que grande parte dos componentes químicos da planta já foram caracterizados e isolados, o uso do extrato de caule de *G. vellosii* pode ajudar a identificar novos alvos moleculares para tratamento do câncer cervical.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Preparo e caracterização do extrato hidroalcoólico de semente de *Euterpe oleracea*

#### 4.1.1. Coleta e acondicionamento dos frutos

Foram coletados frutos nativos em quatro municípios maranhenses (**Figura 5**): São Luís (2° 31' 48" S, 44° 18' 10" W), Axixá (2° 50' 13" S, 44° 3' 10" W), Morros (2° 51' 50" S, 44° 2' 20" W) e Presidente Juscelino (2° 55' 40" S, 44° 3' 54" W) (IBGE, 2010). A coleta foi realizada no mês de outubro de 2019 e 2020; escolheu-se como horário de coleta as primeiras horas da manhã, uma vez que nesses horários as temperaturas do ambiente estão mais amenas, trazendo maior conforto aos coletadores. Após a coleta, os frutos foram acondicionados em refrigeração a -20°C até o uso para preparo dos extratos.



**Figura 5:** Municípios maranhenses em que se deu a coleta dos frutos de açaí para preparo dos extratos.

Além dos frutos, coletaram-se também folhas e flores, para confecção das exsiccatas. O exemplar utilizado foi identificado, com amostra depositada no Herbário Rosa Mochel do Núcleo de Estudos Biológicos da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), sob laudo de número 30, conclusivo para *Euterpe oleracea* Mart., conforme as características da taxonomia.

#### 4.1.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico de *E. oleracea*

O descongelamento ocorreu à temperatura ambiente (em torno de 37° C). Em seguida os frutos foram higienizados com solução de hipoclorito e água destilada. Utilizou-se 1500g de fruto de cada município para preparação dos extratos. Após a pesagem, eram submetidos ao processo de despulpamento em amassadeira elétrica e, em seguida, lavagem adicional em água destilada.

Após o despulpamento e lavagem, as sementes foram mantidas em estufa à temperatura de 40°C por 48h, para secagem. Após esse período, foram conservadas à temperatura de 30°C, a fim de mimetizar a temperatura ambiente na região durante

a época em que o experimento foi realizado, porém, protegendo-os de oscilações de temperatura e excesso de umidade, também frequentes durante o período. As sementes foram submetidas a remoção manual das fibras, seguida de trituração em triturador manual, para obtenção de pó. O rendimento médio do pó triturado das amostras de cada um dos municípios foi em torno de um terço da massa inicial de frutos.

As amostras foram acondicionadas em frascos âmbar, com proteção contra exposição à luz e protegidas de umidade e encaminhadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN)/UFMA, para realização das etapas subsequentes de preparação dos extratos hidroalcoólicos.

A extração se deu por percolação hidroalcoólica, por ser um método clássico para extração de flavonoides – compostos sabidamente presentes nos extratos de *E. oleracea*; macerar o material vegetal e utilizar etanol como solvente garante grande eficiência de extração (Tzanova *et al*, 2020; Echeverry *et al*, 2018). O método garante também maior rendimento que outros métodos como decocção e infusão, por ser um método de extração mais exaustiva (Chanda, Kaneria, 2012). A cada amostra foi adicionado álcool 70% em quantidade suficiente para cobrir todo o pó. Inicialmente o álcool foi misturado à amostra, até homogeneização da mistura. Em seguida, deixado em repouso por uma hora, coberto com papel alumínio, para fotoproteção.



**Figura 6:** Registro do aspecto do extrato obtido por percolação, do 1º ao 21º dia. Observa-se mudança de coloração no líquido que sai do percolador; o processo visa extrair o máximo de produtos do material percolado.

A mistura foi colocada em percolador forrado com filtro de papel Whatman nº 1, com poros de 0,8 mm de diâmetro; o extrato hidroalcoólico produzido no processo era coletado em um béquer coberto por papel alumínio ou em frasco de cor âmbar, a fim de proteger a mistura da interação com a luz. O processo de percolação hidroalcoólica foi realizado durante 21 dias, até esgotamento da extração, identificado

pela alteração no aspecto macroscópico do extrato, quando o mesmo passava à coloração clara (**Figura 6**). A conservação dos filtrados até o final do processo de percolação era feita nos frascos âmbar, sob refrigeração, a cerca de 5°C.

Os extratos foram submetidos a rotaevaporação, a fim de remover o álcool, obtendo-se um extrato aquoso. Durante o processo, a mistura era aquecida até a temperatura máxima de 40 °C, obtendo-se uma mistura viscosa escura, conservada sob refrigeração a -20 °C até a próxima etapa de preparo do extrato.

Para remoção da água presente na mistura, foi realizada a liofilização, última etapa de preparação do extrato, após a qual obteve-se um extrato em pó (**Figura 7**). Os extratos foram pesados e acondicionados em frascos de vidro com tampa vedante, cobertos por duas camadas de papel alumínio intercaladas com 3 camadas de filme plástico e acondicionados em *ultrafreezer* a -80 °C até a realização das análises químicas e testes biológicos nas células.



**Figura 7:** *Aspecto final do extrato hidroalcoólico de E. oleracea após liofilização.*

#### **4.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência**

As análises químicas foram realizadas em parceria com o LQPN, sob coordenação da professora Dra. Claudia Quintino. Uma amostra de cada um dos quatro extratos foi separada para a caracterização química por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Os extratos foram analisados usando um sistema de cromatografia líquida *Shimadzu Prominence* com duas bombas injetoras automáticas Shimadzu LC-20AD. Uma coluna C18 Phenomenex Gemini (250 x 4,6 mm - 5 µm) foi usada nas análises. A fase móvel foi acidificada com água ultrapura e metanol (0,1% HCOOH), a uma taxa de fluxo de 1,0 mL / min, com o gradiente de metanol

aumentando da seguinte forma: 0% de metanol em 0–5 min; 0%-10% de metanol em 5-40 min; 10%-14,5% de metanol em 40-45 min; 19%-55% de metanol em 55-60 min.

O volume de injeção foi de 20,0µL. O aparelho foi acoplado a um espectrômetro de massa equipado com ionização por *eletrospray* e um analisador do tipo *ion-trap* em modo negativo, nas seguintes condições: tensão capilar de 5 kV, capilar temperatura 325°C, fluxo de gás de arrastamento (N<sub>2</sub>) 12 L / min, pressão do nebulizador de nitrogênio a 10 psi. O intervalo de aquisição foi de 100-1500 m/z, com dois ou mais eventos.

#### 4.1.4. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). O processamento e análise dos dados foi feito no Laboratório de Química dos Produtos Naturais/UFMA. Os extratos de semente de *E. oleracea* foram suspensos em 2 mL de metanol (MeOH) para HPLC e centrifugados a 13000 rpm por 5 minutos. 100 µL da solução sobrenadante foram filtrados a 0,22 µm e diluídos em 900 µL de MeOH para HPLC.

As amostras foram analisadas usando um espectrômetro de massa LC Agilent 1200 acoplado ao *Agilent iFunnel 6550 Q-ToF LC/MS*. A ionização por eletropulverização foi operada em modo positivo. A tensão do fragmentador e as energias de colisão foram selecionadas seguindo as condições operacionais de acordo com cada análise durante as infusões. Até 5 precursores por ciclo foram selecionados. Fase estacionária: coluna *Thermo Scientific Accucore C18* 2,6 µm, 2,1 mm x 100 mm. Fase móvel: acetonitrila e ácido fórmico 0,1%. Taxa de fluxo: 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Fase orgânica no modo gradiente de 5% a 98% em 10 minutos, mantendo por 5 min, até 5% em 1,2 min e mantendo por 4,8 min. Tempo total de execução: 21 minutos. Volume de injeção: 2µL. O *software Agilent Mass Hunter* foi usado para processar os espectros.

#### 4.2. Extrato de *Geissospermum vellosii*

Foi utilizado o extrato etanólico da casca de caule do *G. vellosii* (PP) coletado no Horto Jardim Botânico do Rio de Janeiro, gentilmente cedido pela professora Josélia Alencar Lima e cujo método de preparo e caracterização química já foram

descritos anteriormente pela pesquisadora (Lima *et al*, 2009; Lima *et al*, 2016; Lima *et al*, 2020). O extrato em pó foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) puro, a partir do qual prepararam-se as soluções nas concentrações a serem testadas.

### **4.3. Aspectos éticos**

Por se tratar de uma pesquisa envolvendo coleta e análise de representantes da flora brasileira, este estudo foi submetido e aprovado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), com código de cadastro AF1ABAE.

### **4.4. Linhagens celulares**

#### **4.4.1. Linhagens e condições de cultivo**

Para a avaliação biológica dos extratos, foram utilizadas as linhagens celulares imortalizadas de câncer cervical HeLa (relacionada ao HPV 18) e SiHa (relacionada ao HPV 16) e como controle linhagem de células normais de fibroblasto pulmonar humano GM, todas mantidas para crescimento até 80-90% de confluência. As linhagens foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e possuíam certificado de identidade e qualidade (INMETRO, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

As células foram cultivadas de acordo com o descrito pela ATCC, em meio Dulbecco's modificado (DMEM) (Invitrogen) *Low Glucose*, suplementado com antibióticos: penicilina G (60 mg/L) e estreptomicina (100 mg/L) e soro fetal bovino (10%), a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.4.2. Preparo das soluções**

Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®), na concentração 100mg/ml (soluções estoque), a partir do qual prepararam-se as soluções nas concentrações a serem testadas. Para os extratos de *E. oleracea* e *G. vellosii* prepararam-se as concentrações 5, 10, 20, 40, 60 e 120 µg/ml, diluindo a solução estoque em DMEM *Low Glucose*. A gencitabina (GCTB) foi usada nas concentrações 0,00003, 0,0003, 0,003, 0,03, 0,3, 6, e 12 µg/ml.

Nas etapas preliminares do estudo verificou-se redução do efeito das soluções (*dados não mostrados*), sendo possível perceber que as soluções perdiam efeito ao longo do tempo após a preparação. Essa perda de efeito era mais significativa no extrato de semente de *E. oleracea* e praticamente inexistente no extrato de casca de caule de *G. vellosii*. Entretanto, para fins de padronização e a fim de reduzir a perda de efeito das preparações, as soluções preparadas do pó eram utilizadas por até 30 dias e acondicionadas sob refrigeração; as rediluições das soluções em meio eram utilizadas pelo tempo máximo de uma semana.

#### **4.4.3. Ensaio de viabilidade celular**

Após o cultivo, as células foram tripsinizadas, separadas, contadas em câmara de Neubauer, plaqueadas em placas de 96 poços, com densidade de inoculação  $1 \times 10^4$  células/poço, num volume de 100  $\mu$ l, e tratadas com extratos de semente de *E. oleracea*, casca de caule de *G. vellosii*, gencitabina e blendas por 24, 48 e 72h, conforme o desenho de placa. Foram incluídos também poços-controle (contendo células, porém nos quais não foi colocado qualquer tratamento) e veículo (contendo a mesma densidade de células, tratadas com DMSO 0,12%).

Após o tempo pré-determinado de exposição ao tratamento (24, 48 ou 72h) o sobrenadante foi removido e os poços lavados uma vez com 200  $\mu$ l de tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, cada poço recebeu 100  $\mu$ l de uma solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 10% diluído em DMEM.

Após a adição do MTT, as placas foram incubadas por três horas na estufa de CO<sub>2</sub>, protegida da luz. Após esse período, houve descarte do sobrenadante e os poços receberam adição de 100  $\mu$ l etanol e foram submetidas a agitação manual para eluição dos cristais de formazana. A leitura da absorbância dos cristais foi realizada utilizando o leitor de ELISA *Epoch®*, *BioTek Instruments USA*, e o *software Agilent BioTek Gen5*, com comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.4.4. Morfologia celular**

Para avaliação da morfologia celular, as linhagens HeLa e SiHa foram cultivadas em placas de 24 poços, com densidade de inoculação  $2 \times 10^4$  células/poço,

na presença ou não dos extratos e da gencitabina, por 24, 48 e 72h. Após a adição das concentrações de 120 µg/mL do EOSL, IC<sub>50</sub> do PP e 0,3 µg/mL de GCTB + IC<sub>50</sub> do *G. vellosii* às culturas, foram capturadas 3 imagens de cada um dos grupos de tratamento, de um experimento independente de cada célula, durante 24, 48 e 72h de exposição das células às concentrações.

As fotografias foram feitas com o auxílio de um microscópio invertido *Axio Observer Z1* equipado com uma câmera fotográfica *Axiocam HRc Ver.3* com objetiva de 10 x. As imagens foram adquiridas por meio do *software Axiovision Release* (Carl Zeiss Inc., Alemanha). As análises dos registros fotográficos foram realizadas no *software Image J* (Wayne Rasband National Institute of Health, MA) para avaliação de densidade celular, formato, área e perímetro das células.

#### **4.4.5. Ensaio de formação de colônias**

O ensaio clonogênico é um ensaio de sobrevivência baseado na capacidade de uma célula isolada crescer e formar uma colônia. Para tanto, após o cultivo, as células das linhagens SiHa foram tripsinizadas, separadas, contadas em câmara de Neubauer, plaqueadas em placas de 24 poços, com densidade de inoculação de 750 células/poço, num volume de 500µl de DMEM. Após 24h do plaqueamento, as células foram visualizadas ao microscópio para verificar a aderência e tratadas com os compostos ou deixados sem tratamento (poços-controle), que permaneceram por 72 h. Após esse período, foi removido o sobrenadante e os poços lavados com PBS. Os cultivos foram mantidos nas condições usuais durante 10 dias, com trocas de meio a cada 48-72h.

Após 10 dias de cultivo, foi descartado o sobrenadante e os poços lavados com PBS. As colônias foram fixadas com etanol (200 µL) por 10 minutos, depois tiveram o líquido removido e deixadas para secar; em seguida, adicionado 300 µL de solução de cristal violeta (0,05% de violeta de cristal e 20% de etanol) por 10 minutos, lavadas duas vezes com água destilada. Após captura de imagens no microscópio óptico, adicionou-se 500 µL de metanol por 5 minutos, coletou-se 200 µL do eluato e realizou-se a medida de absorvância usando um espectrofotômetro *Epoch®*, *BioTek Instruments* (EUA) e o *software Agilent BioTek Gen5*, com comprimento de onda de 595 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata.

#### 4.4.6. Ensaio de morte celular

A fim de avaliar os mecanismos de morte celular, foi realizado o ensaio *FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis* (Invitrogen, Massachusetts, EUA), conforme recomendações do fabricante. Esse ensaio marca as células com a proteína anexina V, que possui propriedades de ligação aos fosfolipídios como a fosfatidilserina, na presença dos íons de cálcio, para detectar células apoptóticas e células vivas.

O ensaio foi realizado nas linhagens tumorais HeLa e SiHa que, após o cultivo, foram tripsinizadas, separadas, contadas, plaqueadas em placas de 96 poços, com densidade de inoculação  $1 \times 10^4$  células/100 $\mu$ l/poço e tratadas durante 72h (tempo de maior efeito no MTT) com os extratos, blendas ou GCTB, conforme concentrações determinadas nos testes de viabilidade celular. Foram incluídos também poços controle negativo e controle positivo (mesma densidade de células, com DMSO 20%).

Após o tempo pré-determinado de exposição ao tratamento o sobrenadante foi removido e os poços lavados uma vez com 300  $\mu$ l de PBS; as células foram dissociadas com tripsina por 5 minutos, seguido pela inativação da tripsina com DMEM. Em seguida foi adicionado 1ml de solução de PBS com albumina de soro bovino e realizada centrifugação por 5 minutos a 200G, a 5°C. Novamente descartado sobrenadante, realizada ressuspensão com 500  $\mu$ l de DMEM e deixadas sob refrigeração a 4-6°C. Realizada lavagem com 500  $\mu$ l de PBS e nova centrifugação por 5 minutos a 200 G, a 5°C.

Em seguida as células foram incubadas com tampão anexina V e de iodeto de propídio, em temperatura ambiente, por 15 minutos. Em seguida, foram imediatamente analisadas em citômetro de fluxo *Guava EasyCyte HT system* (Merck, Alemanha), com o *software GuavaSoft 3.1.1.* de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram analisados usando o *software FlowJo* (v. 10) Os experimentos foram realizados em triplicata.

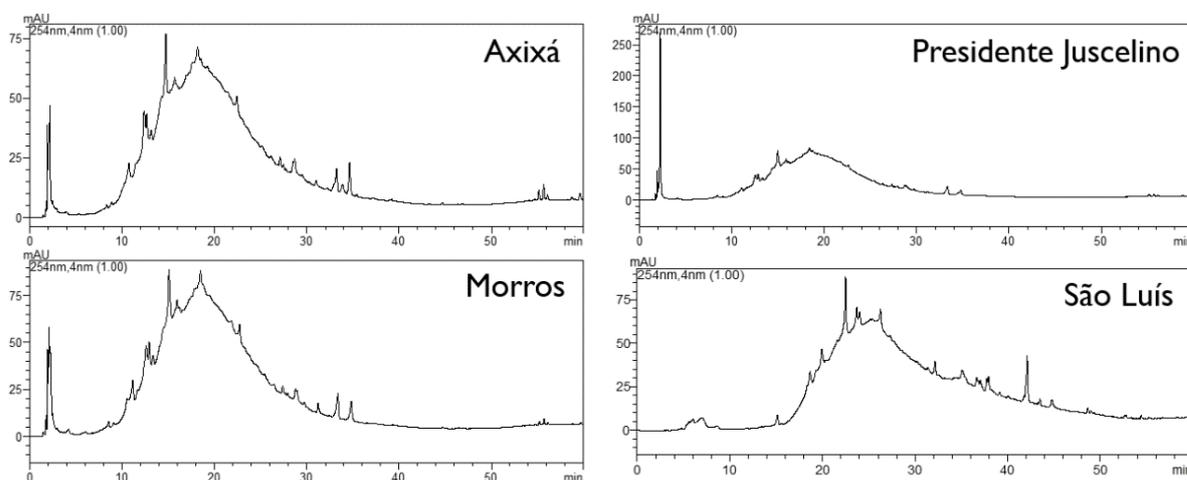
#### 4.5. Análise estatística

Para análise estatística, realizou-se o teste *one-way analysis of variance* (ANOVA), seguido pelos pós-testes de Dunnett ou Tukey's, de acordo com o tipo de análise. As diferenças foram consideradas significativas quando o  $p < 0,05$ . Utilizou-se para a análise o programa *GraphPad Prism* versão 8.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, CA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização química dos extratos hidroalcóolicos de sementes de *E. oleracea*

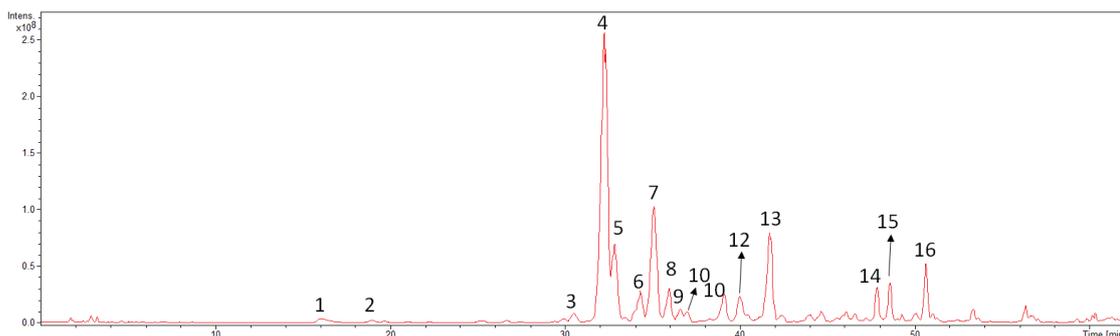
A caracterização por HPLC mostrou não haver diferenças químicas entre os extratos de semente de *E. oleracea* de São Luís, Axixá e Morros, sendo considerado, portanto, iguais, conforme se vê na **figura 8**. O extrato das sementes procedentes de Presidente Juscelino evidenciou um perfil cromatográfico um pouco diferente daqueles dos outros três municípios. Portanto, foram enviados para análise LC-MS apenas dois extratos: o de São Luís e o de Presidente Juscelino.



**Figura 8:** Cromatogramas dos extratos de semente de *E. oleracea* dos quatro municípios maranhenses. É possível notar não haver diferenças química entre os extratos dos frutos provenientes de São Luís, Axixá e Morros, verificando-se o mesmo comportamento cromatográfico e sendo considerados, portanto, um mesmo extrato.

#### 5.1.1. Análise dos extratos hidroalcóolicos das sementes de açaí procedentes dos municípios de São Luís, Axixá e Morros

A espectrometria de massas mostrou que o extrato da *Euterpe oleracea* procedente do município de São Luís (que mostrou igual ao de Axixá e Morros) apresentou 16 picos, como principais compostos dos grupos das catequinas e a procianidinas (**tabela 3**).



**Figura 9:** Espectro de massas do extrato de semente de açai procedente do município de São Luís. É possível notar a presença de dezesseis picos, sendo o pico mais significativo é o de número 4. Os compostos representados por cada pico estão discriminados na **tabela 3**.

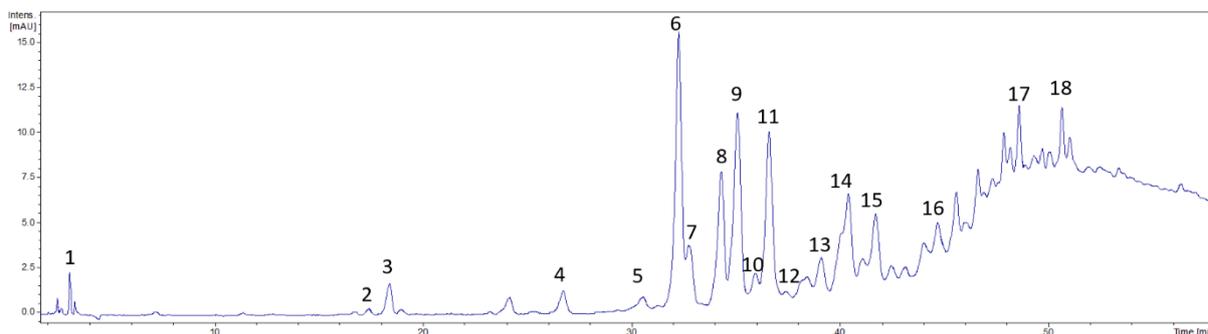
ID	Tempo de retenção(min)	[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>n</sup> *	Composto
1	16	595 (M-H <sub>2</sub> O)	288	Dímero de catequina
2	19	865	695; 577; 407; 289	Trímero de procianidina
3	30.5	865	727; 695; 575; 287	Isômero de trímero de procianidina
4	32.2	579	579; 427; 290	Isômero de dímero de catequina
5	32.9	1155	1029; 985; 579;290	Procianidina tetrâmero-tipo B
6	34.3	867	579; 290	Trímero de procianidina
7	35.1	867	579; 290	Trímero de procianidina
8	36.0	867	579; 290	Trímero de procianidina
9	36.6	1155	867; 579	Isômero de procianidina tetrâmero-tipo B
10	37.0	867	579; 290	Trímero de procianidina
11	39.1	867	579; 291	Trímero de procianidina
12	40.0	722 (M-H <sub>2</sub> O-2H)	579; 427; 290	Trímero de procianidina tipo B C-glicosilado
13	41.7	579	427; 291	Isômero de dímero de catequina
14	47.6	867	579; 427; 289	Isômero de trímero de procianidina
15	48.6	867	579; 289	Isômero de trímero de procianidina
16	50.7	867	579; 289	Isômero de trímero de procianidina

**Tabela 3:** Identificação dos compostos representados pelos picos do espectro de massas do extrato de sementes de *Euterpe oleracea* provenientes do município de São Luís (MA).

### 5.1.2. Análise dos extratos hidroalcológicos das sementes de açai procedentes do município de Presidente Juscelino

A espectrometria de massas mostrou que o extrato da *Euterpe oleracea* procedente do município de Presidente Juscelino (EOJ) apresentou 18 picos, também tendo como principais compostos dos grupos das catequinas e a procianidinas.

Verificou-se ainda a presença de cafeoil-glicose e epicalocatequina galato em quantidades-traço.



**Figura 10:** Espectro de massas do extrato de semente de açaí procedente do município de Presidente Juscelino. É possível notar a presença de dezoito picos, sendo o pico mais significativo é o de número 6. Os compostos representados por cada pico estão descritos na **tabela 4**.

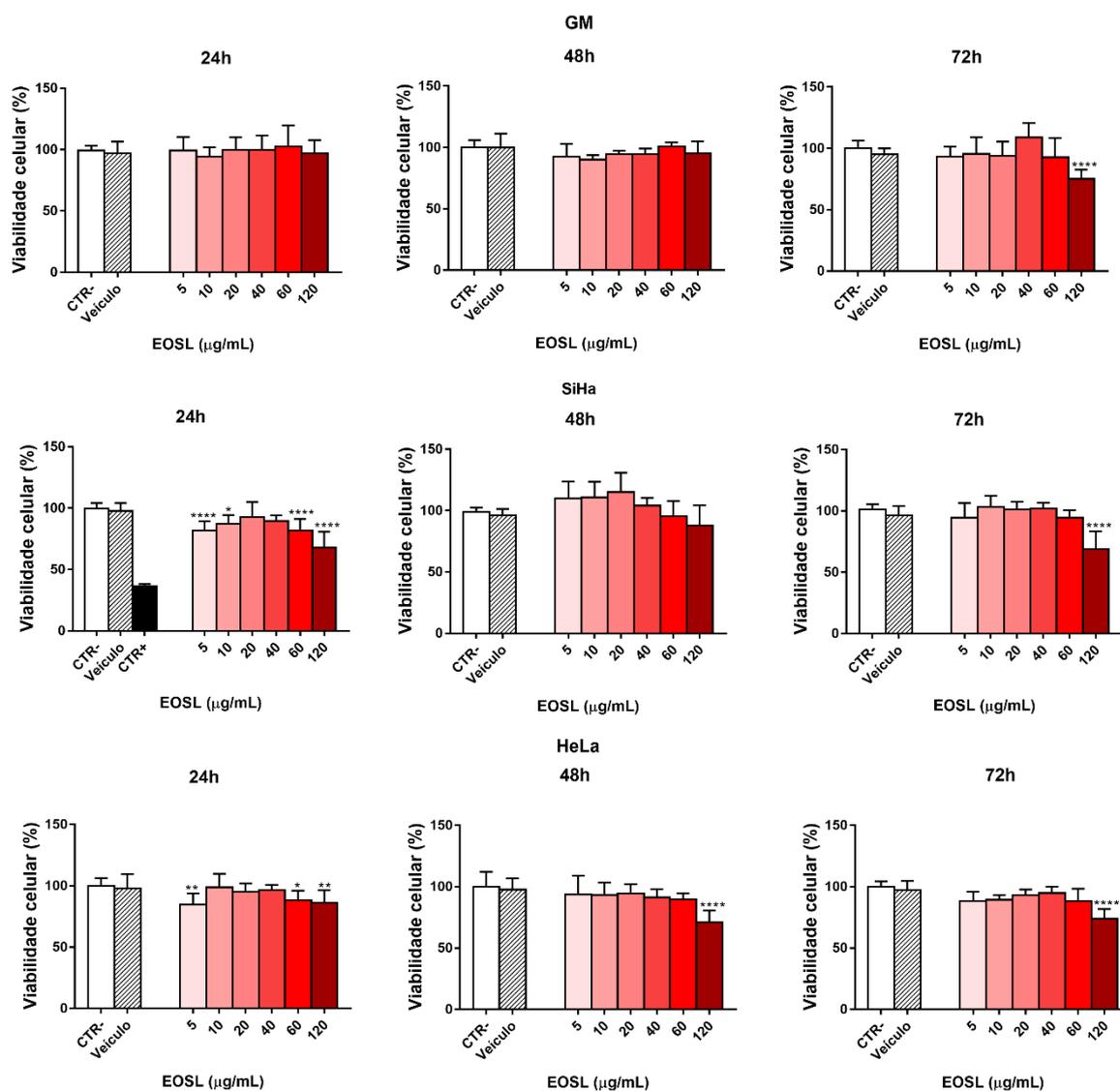
ID	Retention Time (min)	[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>n</sup> *	Compound
1	3.3	343	181	Cafeoil-glicose
2	16.3	595	288	Dímero de catequina
3	19.0	865	695; 577; 289	Trímero de procianidina
4	26.6	457	289; 163	(epi)galocatequina galato
5	30.5	865	727; 695; 575; 287	Isômero de trímero de procianidina
6	32.2	579	579; 427; 290	Isômero de dímero de catequina
7	32.9	1155	1029; 985; 579;290	Procianidina tetrâmero tipo-B
8	34.3	867	579; 290	Trímero de procianidina
9	35.1	867	579; 290	Trímero de procianidina
10	36.0	867	579; 290	Trímero de procianidina
11	36.6	1155	867; 579	Isômero de tetrâmero de procianidina tipo B
12	36.9	867	579; 290	Trímero de procianidina
13	39.0	867	579; 291	Trímero de procianidina
14	40.2	722	579; 290	Trímero de procianidina tipo B C-glicosilado
15	41.7	579	427; 291	Isômero de dímero de catequina
16	45.2	867	579; 427; 289	Isômero de trímero de procianidina
17	48.6	867	579; 289	Isômero de trímero de procianidina
18	50.7	867	579; 289	Isômero de trímero de procianidina

**Tabela 4:** Identificação dos compostos representados pelos picos do espectro de massas do extrato de sementes de *Euterpe oleracea* provenientes do município de Presidente Juscelino (MA).

## 5.2. Efeitos dos extratos na viabilidade celular

Os efeitos citotóxicos dos extratos em diferentes concentrações, isoladamente ou associados entre si, foram avaliados através de testes de MTT nas três linhagens celulares analisadas: HeLa, SiHa e GM.

### Viabilidade celular após o tratamento com extrato de semente de *Euterpe oleracea*



**Figura 11:** Teste de MTT analisando a viabilidade das células GM, SiHa e HeLa após o tratamento com o extrato de semente de açaí. One-way analysis of variance (ANOVA) seguida por Dunnett's pos-hoc test. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Ctrl-: células com DMEM; Veículo: DMSO 0,12%.

### 5.2.1. Citotoxicidade do extrato de semente de *E. oleracea*

Nas células de fibroblasto pulmonar (GM), não houve redução de viabilidade celular após o tratamento com o extrato de semente de *E. oleracea* por 24h e 48h,

nas seis concentrações utilizadas. Setenta e duas horas após o tratamento, observou-se tendência a aumento da viabilidade celular na concentração 40 µg/mL, sem significância estatística; nesse último tempo, houve redução da viabilidade celular na concentração 120 µg/mL.

Na linhagem SiHa o EOSL produziu redução da viabilidade celular nas maiores concentrações (60-120 µg/mL) nas primeiras 24h. Após 48h após o tratamento, observou-se tendência à redução da viabilidade, sem significância estatística. Em 72h, houve redução significativa da viabilidade celular na concentração 120 µg/mL.

A citotoxicidade do EOSL nas células HeLa foi semelhante à observada nas SiHa: não houve redução significativa de viabilidade celular nas primeiras 24h, porém observou-se uma tendência de reduzi-la na maior concentração. Após 48h a redução de viabilidade das células tratadas com 120 µg/mL do extrato mostrava significância estatística. Essa redução se acentuou 72 horas após o tratamento.

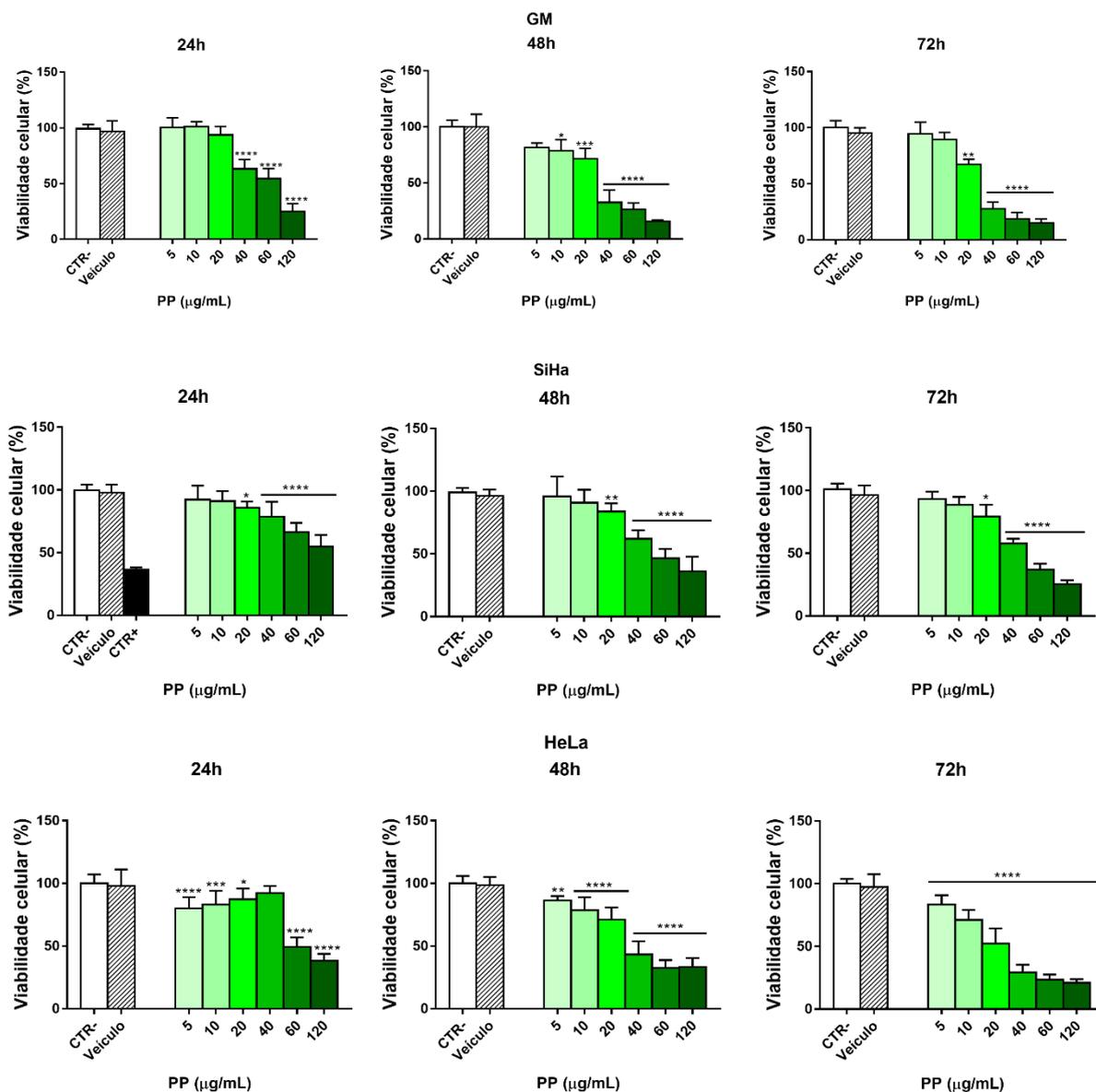
### 5.2.2. Citotoxicidade do extrato de *G. vellosii*

O extrato de *G. vellosii* foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular de GM de maneira tempo e concentração dependente, com efeito evidente após 24h nas maiores concentrações (40-120 µg/mL). Houve acentuação do efeito após 48h-72h, notadamente a partir de 20 µg/mL.

Com base nessa resposta concentração-dependente, foi possível delinear a curva de concentrações x viabilidade celular e determinar a concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) desse extrato nas células GM em 72h, sendo  $34,15 \pm 1,77$  µg/mL (**Figura 13**).

Na linhagem SiHa o *G. vellosii* também mostrou efeito citotóxico concentração-dependente ainda nas primeiras 24h, partir da concentração 20 µg/mL. Esse efeito se intensificou progressivamente após 48h e 72h, nas mesmas concentrações, evidenciando que o efeito desse extrato nas células SiHa foi concentração e tempo dependente. Obteve-se a curva de concentrações nessa linhagem e, a partir dela, calculou-se a IC<sub>50</sub> de  $53,08 \pm 2,45$  µg/mL (**Figura 13**).

### Viabilidade celular após o tratamento com extrato de *Geissospermum vellosii*



**Figura 12:** Teste de MTT analisando a viabilidade das células GM, SiHa e HeLa após o tratamento com o extrato de casca de caule de pau-pereira. One-way analysis of variance (ANOVA) seguida por Dunnett's pos-hoc test. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Ctrl-: células com DMEM; Veículo: DMSO 0,12%.

O PP também mostrou atividade tempo e concentração dependente evidente na linhagem HeLa. Após 24h do tratamento, notou-se efeito citotóxico significativo a partir de 60 µg/mL. Essa citotoxicidade concentração-dependente se acentuou após 48h, quando se tornou mais evidente a partir de 10 µg/mL; após 72h, a redução de viabilidade celular foi mais marcante e observada em todas as concentrações.

A partir da relação entre viabilidade celular e concentração do extrato, foi possível desenhar uma curva de concentrações x viabilidade celular, por meio da qual determinou-se para a HeLa a  $IC_{50} = 25,57 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$  (Figura 13).

#### Curva dose-resposta e determinação da concentração inibitória média do *G. vellosii*

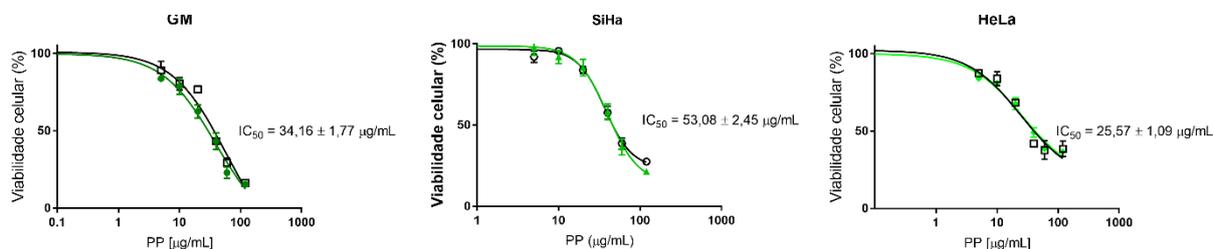


Figura 13: Curva dose-resposta e  $IC_{50}$  do *G. vellosii* nas linhagens GM, SiHa e HeLa, 72 horas após o tratamento.

#### 5.2.3. Citotoxicidade da Gencitabina

Os efeitos da gencitabina nas células GM foram pouco significativos nas primeiras 24h, porém observável nas maiores concentrações. Após 48h e, de modo mais evidente, após 72h, houve redução de viabilidade celular a partir da concentração  $0,03 \mu\text{g/mL}$ , de maneira estatisticamente significativa.

A citotoxicidade da gencitabina – quimioterápico padrão – em linhagens GM (controle) serviu como ponto de partida para a definição das concentrações a serem utilizadas desse quimioterápico nas demais linhagens. Por esse motivo, após uma testagem preliminar, foram selecionadas as seis concentrações de gencitabina utilizadas que, em GM, permitiram o delineamento da curva concentração x viabilidade celular e, conseqüentemente, da  $IC_{50}$  do fármaco nessa linhagem,  $0,20 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$  (figura 14).

#### Curva dose-resposta e determinação da concentração inibitória média da GCTB em GM

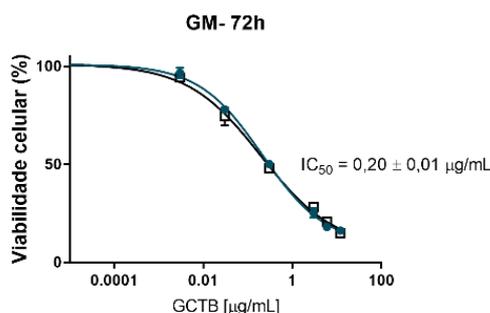
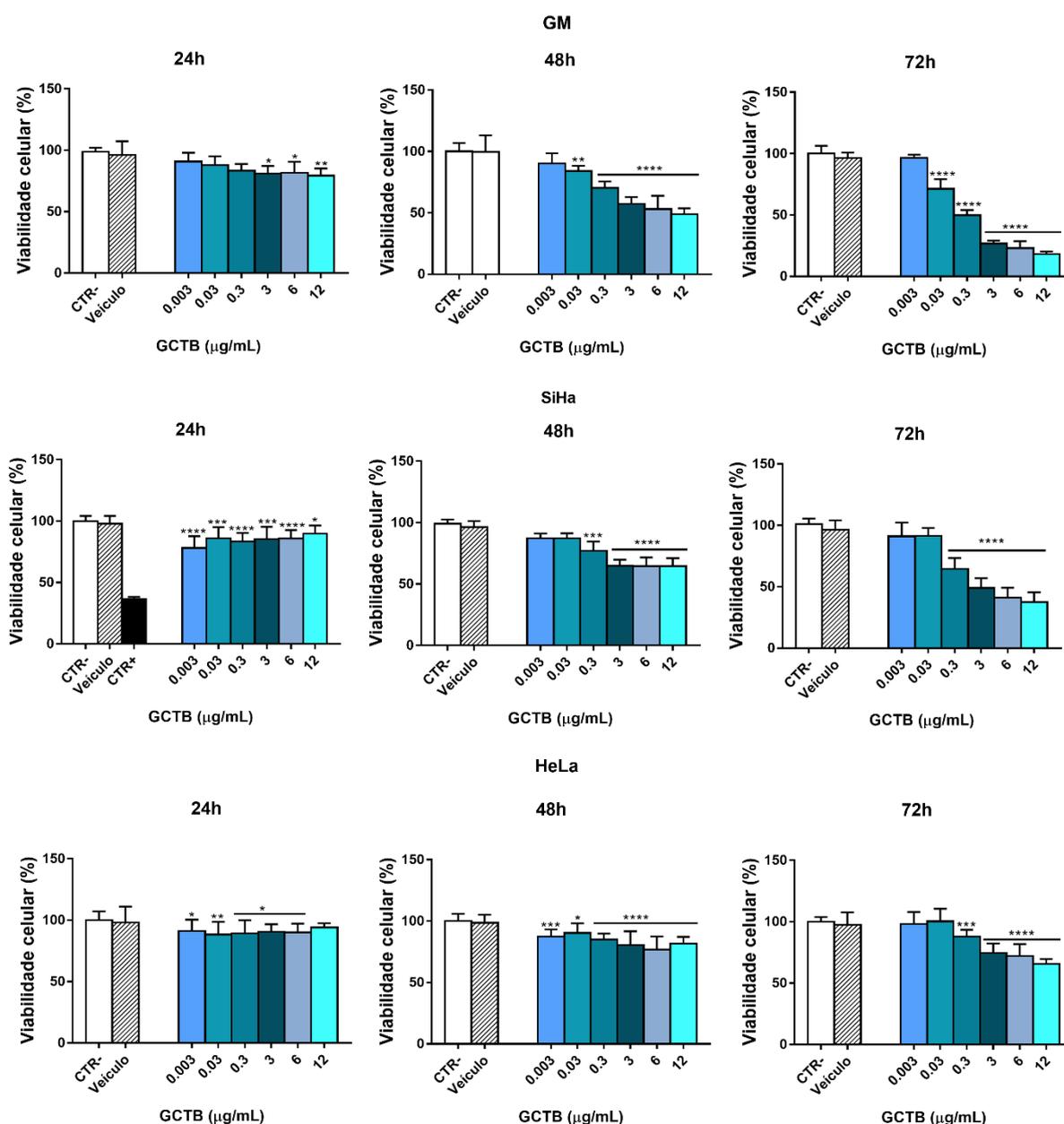


Figura 14: Curva dose-resposta e  $IC_{50}$  da gencitabina em GM.

Em SiHa, nas primeiras 24h após o tratamento com gencitabina em diferentes concentrações, observou-se redução de viabilidade celular de modo paradoxal: com tendência à menor viabilidade em menores concentrações e maior viabilidade nas concentrações mais elevadas. Após 48h delineou-se uma redução de viabilidade de modo concentração-dependente a partir de 0,3 µg/mL. Esse efeito se acentuou nas mesmas concentrações após 72h.

### Viabilidade celular após o tratamento com Gencitabina



**Figura 15:** Teste de MTT analisando a viabilidade das células GM, SiHa e HeLa após o tratamento com o gencitabina. *One-way analysis of variance (ANOVA)* seguida por Dunnett's pos-hoc test. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Ctrl-: células com DMEM; Veículo: DMSO 0,12%.

Na linhagem HeLa a gencitabina teve efeito menos evidente que o observado em SiHa. Embora nas primeiras 24h o fármaco não tenha sido capaz de reduzir substancialmente a viabilidade celular, houve redução a partir de 0,3 µg/mL em 48h e 72h. Nesse último tempo o efeito citotóxico observado foi significativamente maior.

#### **5.2.4. Citotoxicidade da blenda da gencitabina com o extrato de semente de *E. oleracea***

Após testar os extratos e gencitabina isoladamente e em posse dos resultados obtidos naqueles experimentos, elaboraram-se experimentos para verificar o potencial dos extratos para reduzir a dose necessária de quimioterápicos. Nesses experimentos associava-se a gencitabina na concentração 0,3 µg/ml (concentração a partir da qual o fármaco reduziu a viabilidade celular das linhagens tumorais) com as menores concentrações de extratos que haviam sido testadas, para verificar se haveria aumento de efeito citotóxico nas associações.

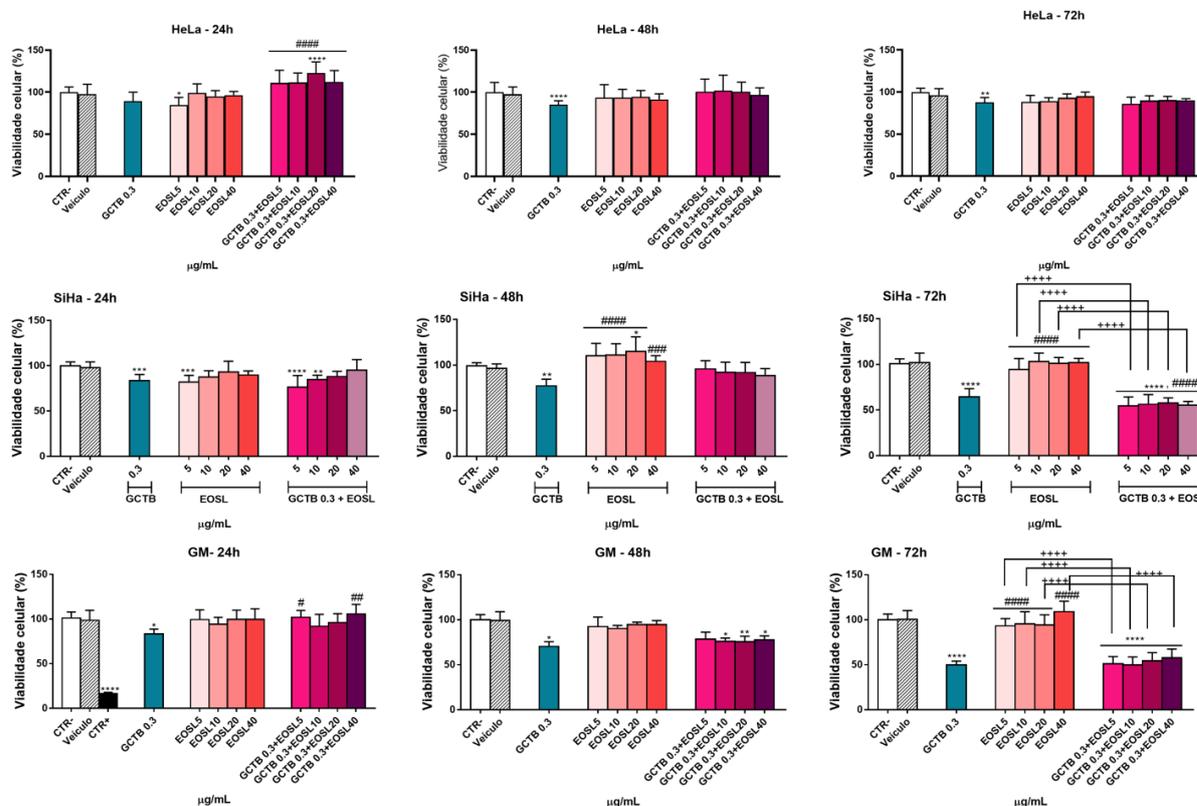
Conforme se verifica na **figura 16**, na linhagem HeLa não houve ganho de citotoxicidade ao associar as menores concentrações de EOSL com a gencitabina. De maneira paradoxal, observou-se, após 24h, aumento da viabilidade das células tratadas com essa combinação, quando comparadas ao controle negativo, sugerindo, portanto, efeito proliferativo dessa blenda.

Na linhagem SiHa, após 72h do tratamento, observou-se aumento da citotoxicidade da associação, quando comparada tanto à GCTB quanto ao EOSL testados isoladamente, sugerindo benefício nessa combinação e permitindo supor que, provavelmente, esses compostos atuam por mecanismos diferentes, de modo a não competirem entre si. Nesse contexto, seria possível associar componentes o EOSL para intensificar o efeito quimioterápico da gencitabina nessa linhagem celular.

Em GM, por sua vez, observou-se que a blenda manteve apenas o efeito citotóxico já observado na gencitabina isoladamente. Nessa linhagem, portanto, não houve aumento de efeito citotóxico em associar o EOSL ao quimioterápico padrão, o que se torna favorável à associação, uma vez que essas células representam uma linhagem normal. Esse seria, portanto, um efeito a ser buscado, uma vez que, teoricamente, seria possível aumentar os efeitos citotóxicos necessários ao

tratamento de câncer cervical, sem aumentar os efeitos adversos (decorrente do efeito do fármaco nas células normais).

### Viabilidade celular após o tratamento com blenda GCTB + EOSL



**Figura 16:** Teste de MTT analisando a viabilidade das três linhagens celulares após o tratamento com a blenda entre a gencitabina e o extrato de semente de *Euterpe oleracea*. One-way analysis of variance (ANOVA) seguida por Dunnett's ou Tukey's pos-hoc test. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . \*Comparação do composto com o controle; #: Comparação da GCTB com as blendas; +: comparação das quatro concentrações (EOSL ou PP) das blendas com os compostos isoladamente. Ctrl.: células com DMEM; Veículo: DMSO 0,12%.

### 5.2.5. Citotoxicidade da blenda da gencitabina com o extrato de casca de caule de *G. vellosii*

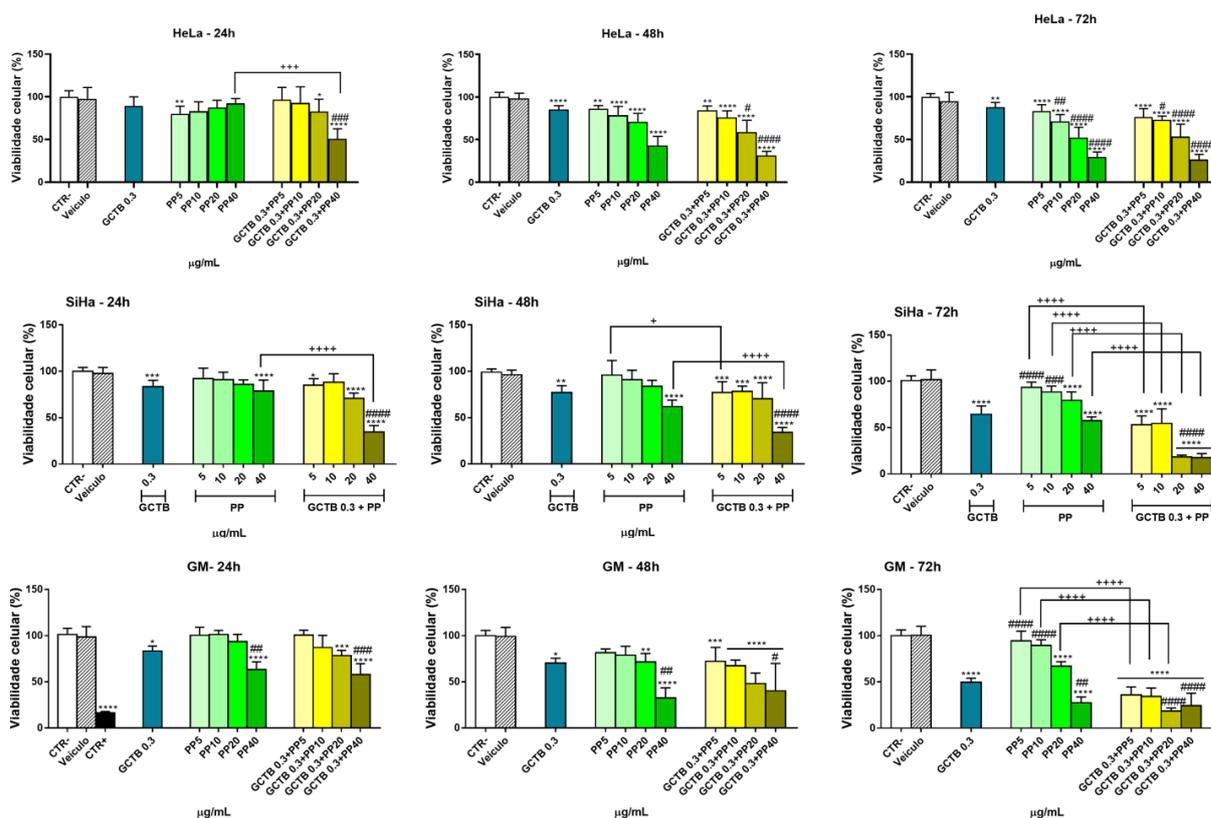
Ao testar a associação entre a gencitabina e o extrato de casca de caule *G. vellosii* na linhagem HeLa observou-se, após 24h, aumento da citotoxicidade na associação de GCTB 0,3 µg/ml ao PP 40 µg/ml, quando comparada ao fármaco ou extrato, isoladamente, nas mesmas concentrações. Esse efeito não permaneceu ao observarem-se os experimentos de 48 e 72h, nos quais observa-se um efeito equivalente ao do PP isolado, portanto, sem benefício na combinação.

Na linhagem SiHa, após 72 h é possível perceber maior citotoxicidade nas blendas PP-GCTB, de maneira concentração-dependente e mais significativa em (5-

20-40  $\mu\text{g/ml}$  de *Geissospermum vellosii*. É possível verificar na **figura 17** que esse efeito citotóxico é significativamente maior que o observado tanto para a GCTB como para o PP isoladamente, nas mesmas concentrações. Diante de tal efeito, é possível supor que os componentes dessa associação atuam por mecanismos distintos e que, portanto, componentes químicos do extrato poderiam ser usados em associação à gencitabina, com aumento do poder citotóxico deste fármaco.

Em GM (**Figura 17**), após 72h, também se observa maior citotoxicidade apenas quando a gencitabina 0,3  $\mu\text{g/ml}$  é associada ao *G. vellosii* 20 $\mu\text{g/ml}$ , tanto quando comparada ao fármaco quanto ao extrato isoladamente. Em concentrações menores de PP (5-10  $\mu\text{g/ml}$ ) não se observa diferença com relação ao efeito citotóxico observado na gencitabina. Na associação de GCTB com 40 $\mu\text{g/ml}$  de PP não se observou aumento de citotoxicidade com relação à observada no extrato testado isoladamente.

#### Viabilidade celular após o tratamento com blenda GCTB + PP

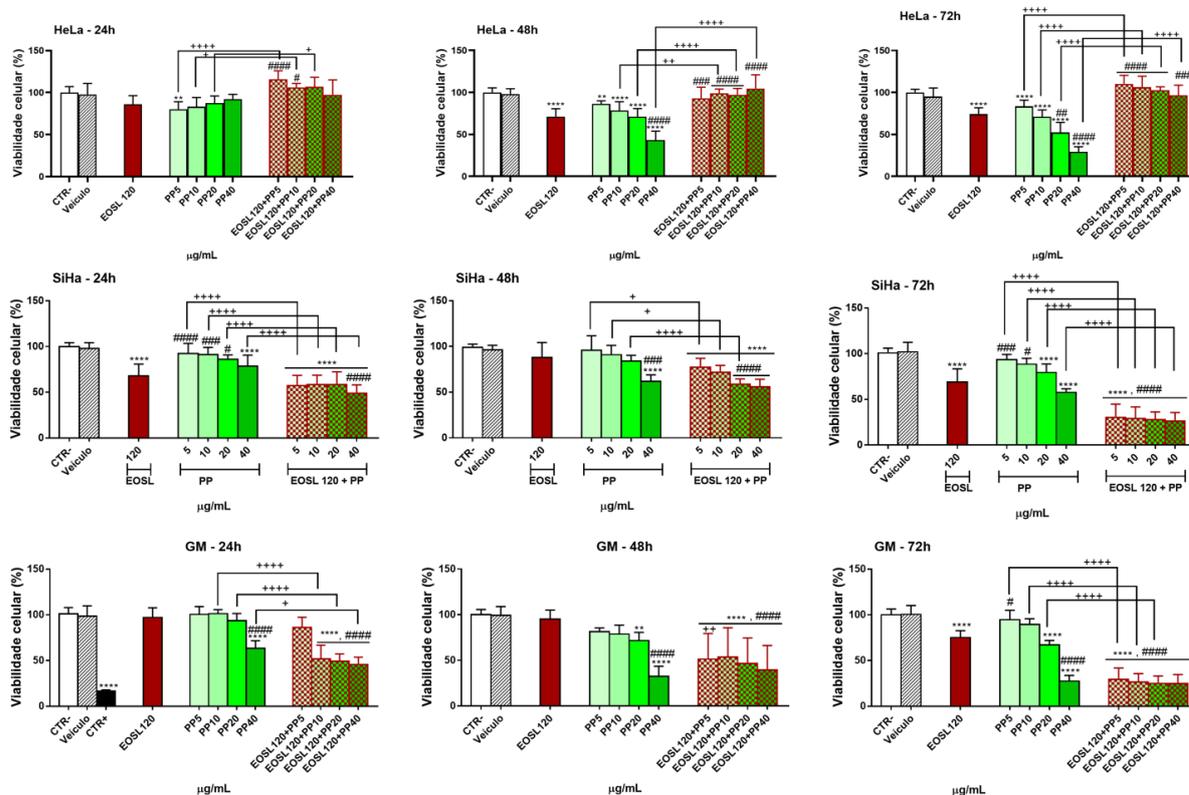


**Figura 17:** Teste de MTT analisando a viabilidade das três linhagens celulares após o tratamento com a blenda entre a gencitabina e o extrato de casca de caule de *Geissospermum vellosii*. *One-way analysis of variance* (ANOVA) seguida por Dunnett's ou Tukey's pos-hoc test. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . \* Comparação do composto com o controle negativo; #: Comparação da GCTB com as blendas; +: comparação das quatro concentrações (EOSL ou PP) das blendas com os compostos isoladamente. Ctrl-: células com DMEM; Veículo: DMSO 0,12%.

### 5.2.6. Citotoxicidade da blenda entre os extratos de semente de *E. oleracea* e casca de caule de *G. vellosii*

Testaram-se, ainda, associações do extrato de semente de *E. oleracea* na concentração de 120 µg/ml (única concentração na qual se observou algum efeito citotóxico) com o extrato de casca de caule *G. vellosii* em concentrações de 5 a 40 µg/ml, a fim de verificar se uma combinação dos extratos teria efeito citotóxico mais evidente que o observado nesses compostos isoladamente.

#### Viabilidade celular após o tratamento com blenda EOSL + PP



**Figura 18:** Teste de MTT analisando a viabilidade das três linhagens celulares após o tratamento com a blenda entre o extrato de semente de *Euterpe oleracea* e o extrato de casca de *Geissospermum vellosii*. *One-way analysis of variance* (ANOVA) seguida por Dunnett's ou Tukey's pos-hoc test. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . \*Comparação do composto com o controle; #: Comparação EOSL com as blendas; +: comparação das quatro concentrações (EOSL ou PP) das blendas com os compostos isoladamente. Ctrl-: células com DMEM; Veículo: DMSO 0,12%.

Em HeLa a associação não produziu efeito citotóxico: paradoxalmente, levou a aumento significativo da viabilidade celular em 24, 48 e 72h, independente da concentração de PP usada, sugerindo efeito proliferativo. Na linhagem SiHa os resultados da associação foram mais promissores, observando-se, já em 24h, redução da viabilidade celular na maior concentração de PP (40 µg/ml) mais significativa que a observada isoladamente em cada um dos extratos. Em 72h,

observa-se o efeito pleno dessa associação, atingindo-se praticamente o dobro da citotoxicidade observada tanto no EOSL quanto no PP isoladamente.

O efeito observado em GM foi similar ao de SiHa: aumento de citotoxicidade provocado pela associação, em 24h, e, de modo mais significativo, em 72h. Chama atenção, entretanto, que nessa linhagem a citotoxicidade dessa blenda é concentração-dependente, conforme aumenta-se a concentração de PP. Observando-se novamente o gráfico de SiHa, percebe-se um efeito mais “em platô”, sem relação direta com o aumento de concentração.

### 5.3. Efeitos dos extratos na morfologia celular

Após a observação dos efeitos dos extratos de *E. oleracea*, *G. vellosii* e gencitabina isoladamente, buscou-se observar se esses compostos produziram alterações significativas na morfologia das células tumorais. Para tanto as células foram tratadas com esses compostos ou deixadas sem tratamento (grupo controle) e fotografadas após 24h, 48h e 72h em microscópio invertido. Em seguida, os resultados foram tratados no *software ImageJ*.

Considerando que os efeitos mais significativos foram verificados após 48 e 72 horas do tratamento, foram selecionadas as imagens nesses tempos para a realização das medidas e comparações. Após 72h do início do experimento, as células HeLa não tratadas (controle) tinham área  $8,3 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$  e perímetro  $415,8 \pm 65,2 \mu\text{m}$  (**figura 19**). As células SiHa controle tinham área  $7,2 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$  e perímetro  $411,6 \pm 70 \mu\text{m}$  (**figura 20**).

**TABELA 5: Medidas de morfologia das células após o tratamento com os compostos**

Tratamento utilizado	Área		Perímetro	
	SiHa	HeLa	SiHa	HeLa
<b>Controle</b>	$7,2 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$	$8,3 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$	$411,6 \pm 70 \mu\text{m}$	$415,8 \pm 65,2 \mu\text{m}$
<b>Gencitabina</b>	$10,6 \pm 2,6 \mu\text{m}^2$	$7,0 \pm 2,4 \mu\text{m}^2$	$472,4 \pm 79,5 \mu\text{m}$	$376,3 \pm 88,6 \mu\text{m}$
<b>EOSL</b>	$6,7 \pm 2,0 \mu\text{m}^2$	$6,6 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$	$406,7 \pm 86,3 \mu\text{m}$	$401 \pm 59 \mu\text{m}$
<b>PP</b>	$5,1 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$	$1,0 \pm 0,4 \mu\text{m}^2$	$373,0 \pm 72,2 \mu\text{m}$	$117,6 \pm 21,9 \mu\text{m}$

### **5.3.1. Alterações morfológicas após tratamento com o extrato de semente de *E. oleracea***

O EOSL na concentração de 120 µg/mL produziu alterações morfológicas discretas nas linhagens HeLa, mais evidentes após 72h do tratamento (área da célula:  $6,6 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$ ; perímetro:  $401 \pm 59 \mu\text{m}$ ). Na linhagem SiHa, foram observadas alterações morfológicas ainda mais sutis e também mais evidentes após 72h do início do tratamento (área da célula:  $6,7 \pm 2,0 \mu\text{m}^2$ ; perímetro:  $406,7 \pm 86,3 \mu\text{m}$ ).

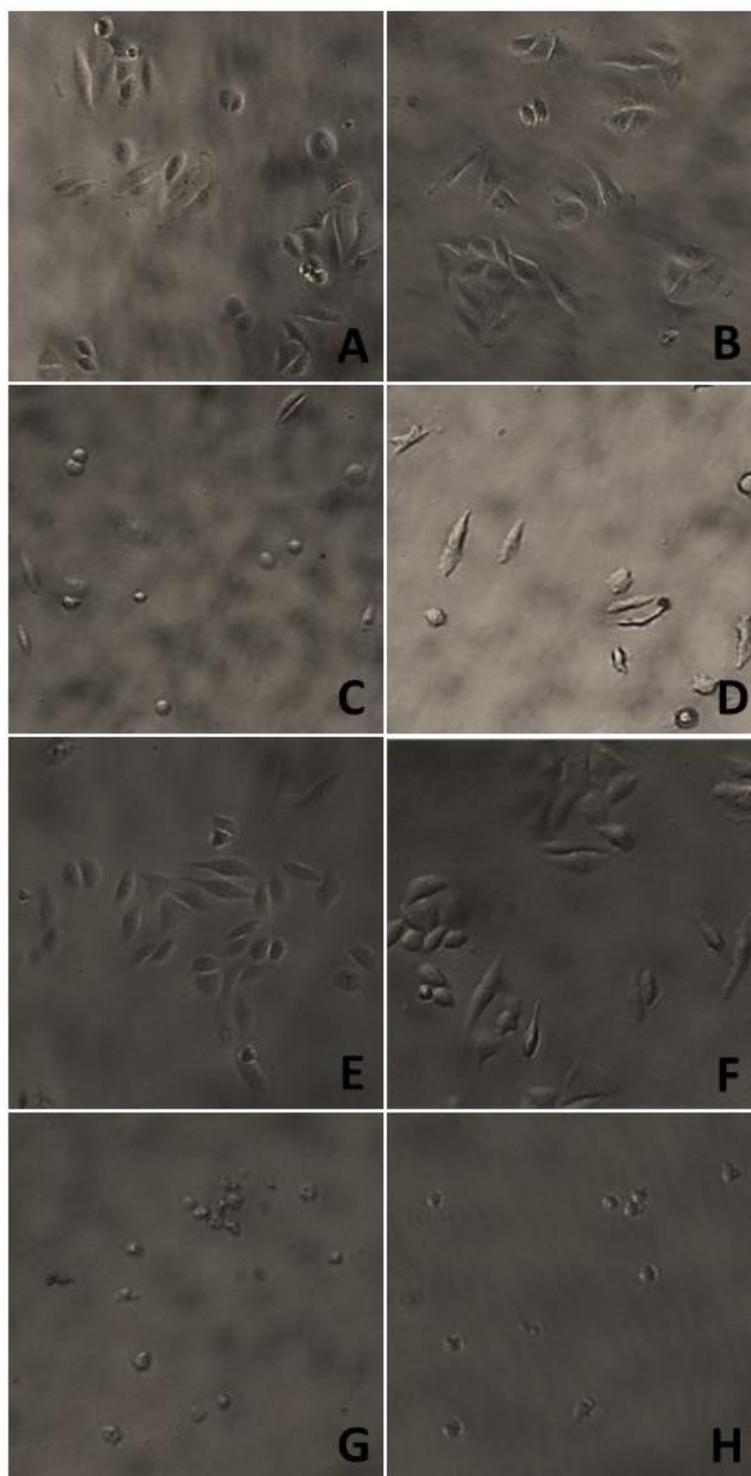
### **5.3.2. Alterações morfológicas após tratamento com o extrato de *G. vellosii***

Foram verificados efeitos significativos na morfologia celular após o tratamento das células com o extrato de *G. vellosii* de acordo com a IC<sub>50</sub> de cada linhagem de câncer cervical. Em HeLa, embora já tenham sido observadas alterações de perímetro e área celular após 24h do tratamento, as alterações mais significativas foram verificadas após 72h. Nesse tempo houve significativa redução da densidade celular, além de marcante redução da área das células ( $1,0 \pm 0,4 \mu\text{m}^2$ ) e do perímetro das mesmas ( $117,6 \pm 21,9 \mu\text{m}$ ).

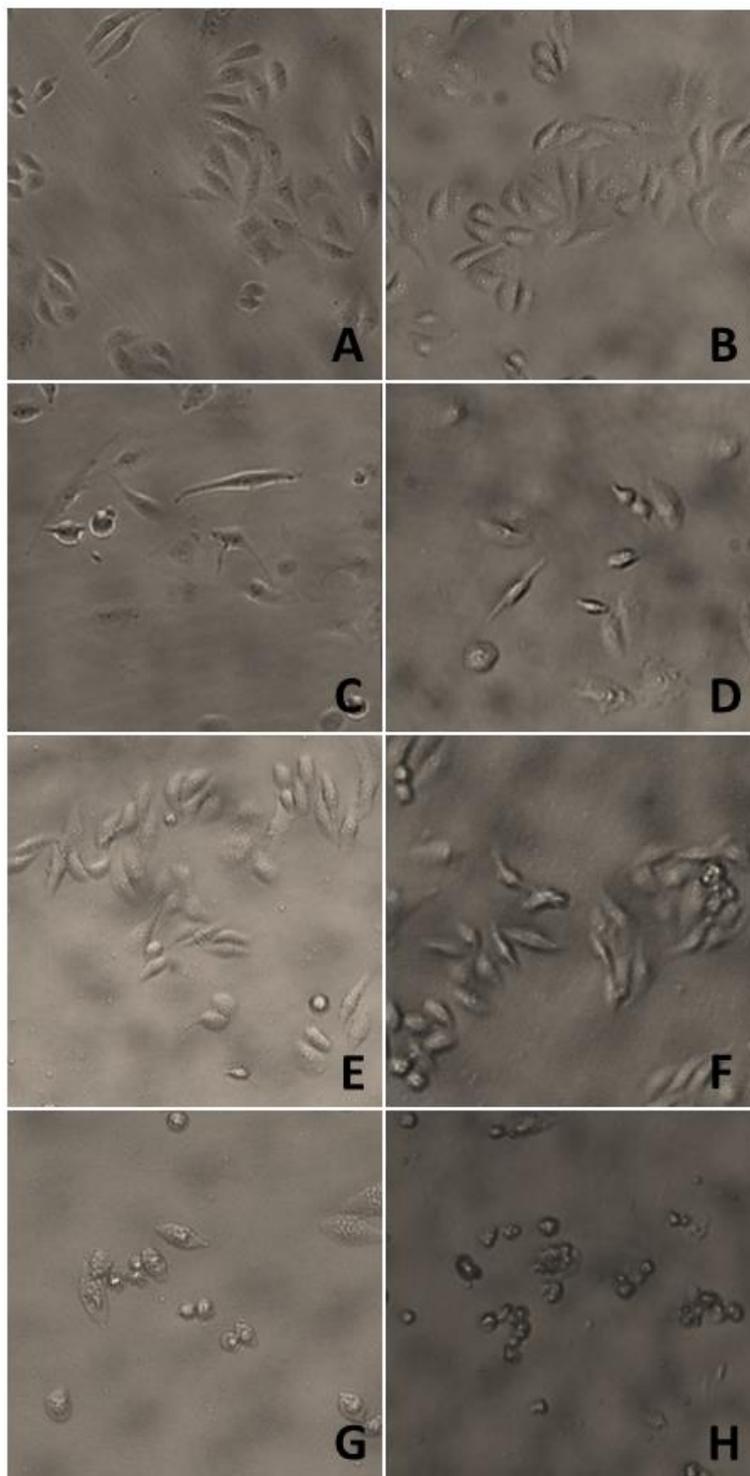
Na linhagem SiHa, as alterações morfológicas foram menos evidentes, com as mais significativas observadas 48h após o tratamento (área das células  $5,1 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$ ; perímetro:  $373,0 \pm 72,2 \mu\text{m}$ ); também foi observada redução na população das células, de modo menos evidente que o observado em HeLa. A presença de alterações morfológicas menos importantes corrobora a maior tolerabilidade dessa linhagem celular ao extrato de *G. vellosii*, conforme já evidenciado nos ensaios de viabilidade celular.

### **5.3.3. Alterações morfológicas após tratamento com gencitabina**

Conforme já havia sido delineado nos ensaios de citotoxicidade, os maiores efeitos da gencitabina foram observados após 72h. Após esse período, observou-se em SiHa um aumento da área ( $10,6 \pm 2,6 \mu\text{m}^2$ ) e do perímetro das células ( $472,4 \pm 79,5 \mu\text{m}$ ). Na linhagem HeLa as alterações foram mais discretas (área  $7,0 \pm 2,4 \mu\text{m}^2$ ; perímetro  $376,3 \pm 88,6 \mu\text{m}$ ) quando comparadas aos controles.



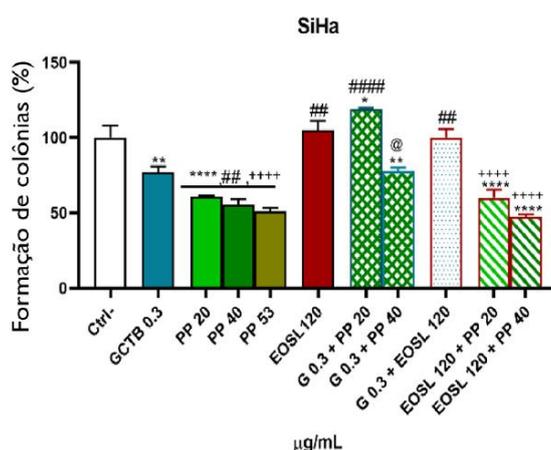
**Figura 19:** Imagens de microscopia óptica da linhagem HeLa. Na primeira coluna, as fotografias foram registradas 48 horas após o tratamento; na segunda coluna após 72h. A e B correspondem ao controle (células sem tratamento); C e D células tratadas com gencitabina; E e F células tratadas com EOSL; G e H células tratadas com PP.



**Figura 20:** Imagens de microscopia óptica da linhagem SiHa. Na primeira coluna, as fotografias foram registradas 48 horas após o tratamento; na segunda coluna após 72h. A e B correspondem ao controle (células sem tratamento); C e D células tratadas com gentamicina; E e F células tratadas com EOSL; G e H células tratadas com PP.

#### 5.4. Efeitos dos extratos na formação de colônias de células

O ensaio clonogênico foi realizado, a fim de avaliar se os efeitos sobre a redução da viabilidade celular e formação de novas colônias se mantinha após a remoção do tratamento. Utilizaram-se células da linhagem SiHa, tratada com os extratos e blendas por 72 horas.



**Figura 21:** Ensaio clonogênico na linhagem SiHa, evidenciando a formação de novas colônias de células, 10 dias após remoção do tratamento com gencitabina, extratos ou blendas. *One-way analysis of variance* (ANOVA) seguida por Tukey's *pos-hoc test*. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. \*: comparação com o controle negativo; #: comparação com a GCTB; +: comparação com o EOSL; @: comparação com o PP40. Ctrl-: células com DMEM.

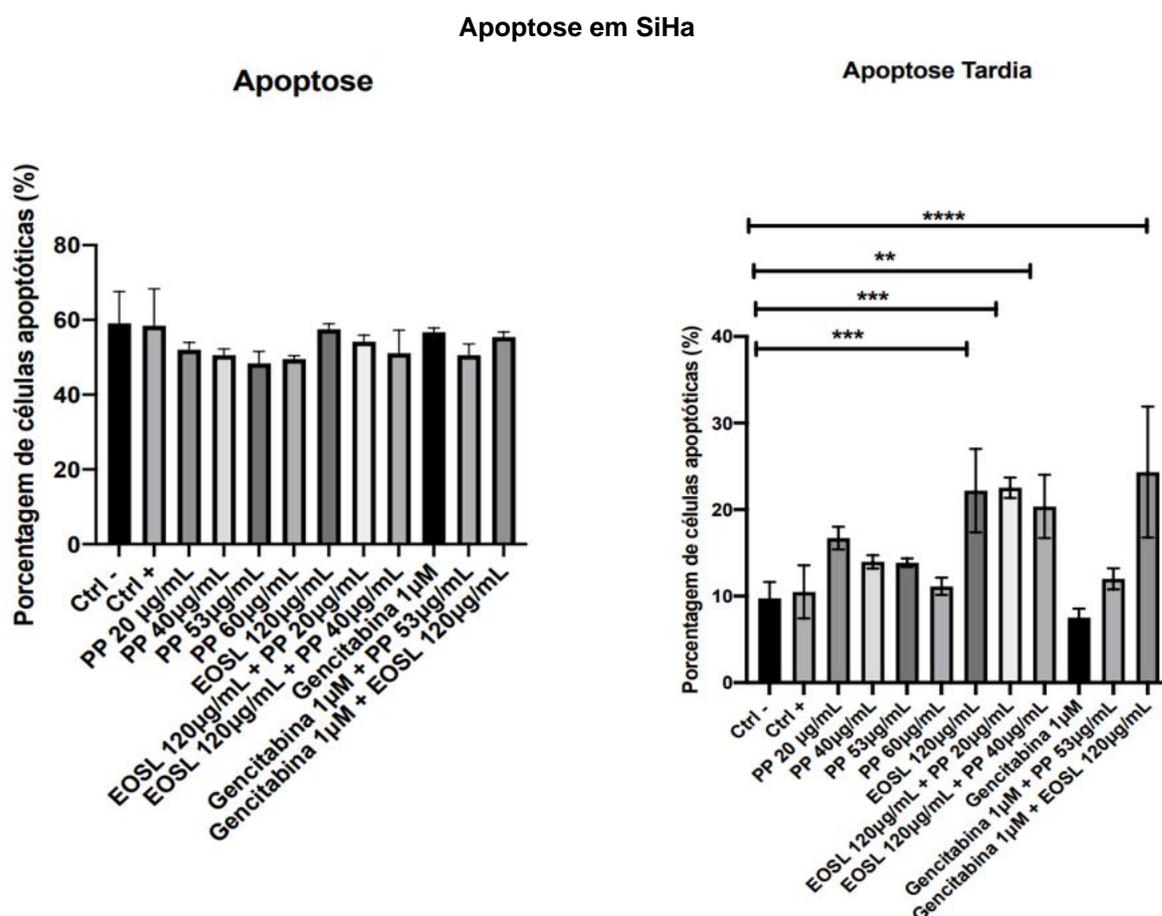
Observou-se capacidade de reduzir a viabilidade celular/formação de novas colônias de modo mais significativo no PP, sem diferença estatística entre as concentrações de 20-40 µg/mL e 53 µg/mL (IC<sub>50</sub> determinada a partir do MTT). Esse efeito foi mais significativo que o observado para a gencitabina isoladamente, na concentração de 0,3 µg/mL. O EOSL na concentração de 120 µg/mL, embora tenha sido capaz de reduzir a viabilidade celular no ensaio de MTT, não teve permanência desse efeito após remoção do tratamento, conforme observado neste ensaio clonogênico, sugerindo, portanto, baixo potencial para uso clínico como quimioterápico.

A associação entre a GCTB na concentração 0,3 µg/mL com o PP só foi capaz de reduzir a viabilidade celular quando a concentração deste último foi de 40 µg/mL. Entretanto, esse efeito foi menos significativo que o observado para o PP isoladamente e sem diferença com relação à GCTB isolada, sugerindo, portanto, ausência de efeito desta associação sobre a formação de novas colônias de células. A associação da GCTB com o EOSL não foi capaz de reduzir a formação de novas colônias.

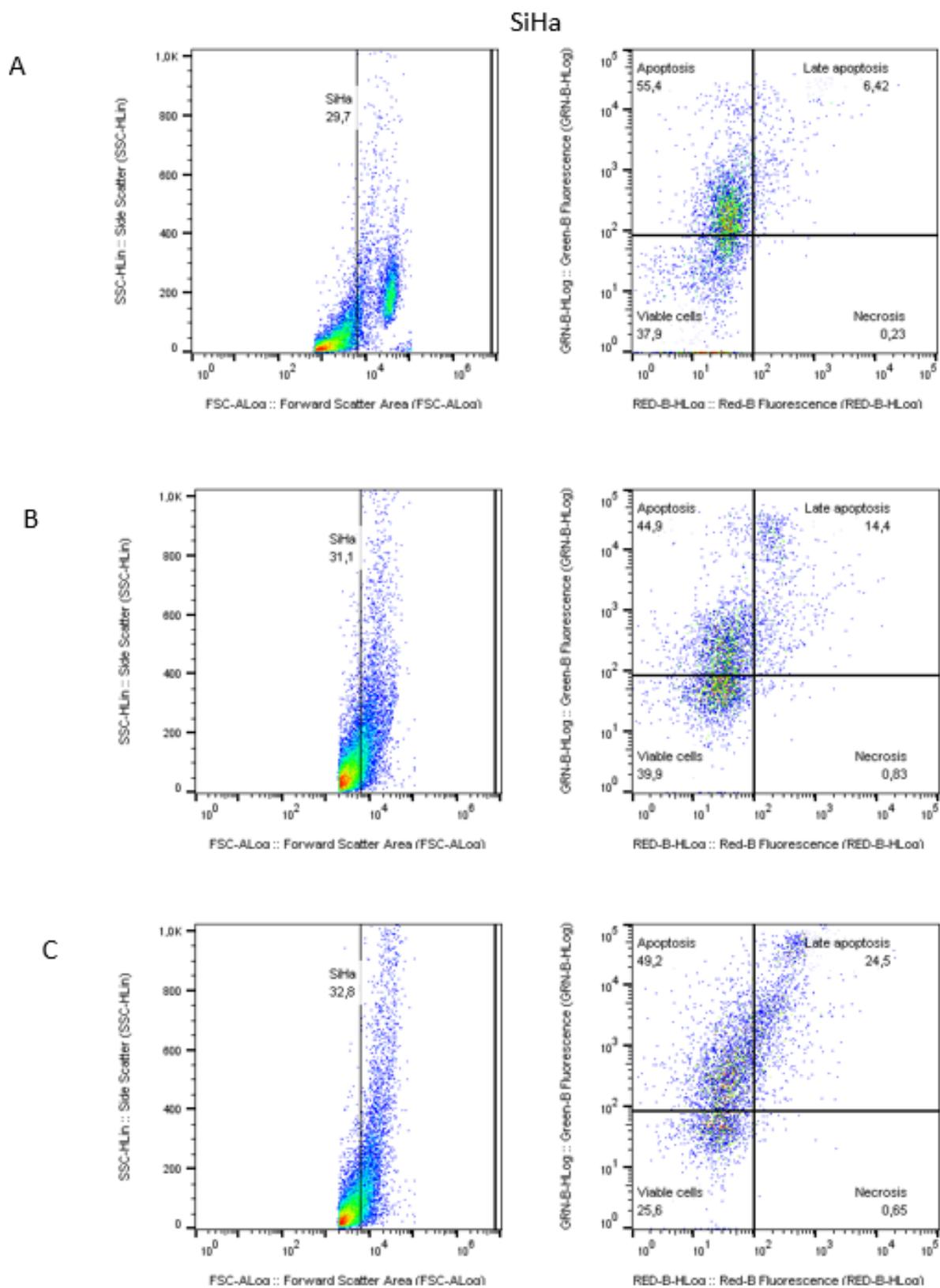
O efeito observado de forma mais intensa das blendas na formação de colônias foi verificado na associação entre o EOSL 120 µg/mL com o PP, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa com relação ao observado para o PP isoladamente.

### 5.5. Mecanismos de morte celular dos extratos

No ensaio de anexina V, para a linhagem SiHa (figuras 22 e 23) não foi possível verificar diferença entre os extratos, blendas e controle negativo com relação aos eventos de apoptose inicial, sendo, portanto, pouco conclusivo para esta etapa. Com relação à apoptose tardia, as maiores taxas foram verificadas nas células tratadas com EOSL isoladamente, blendas EOSL+PP e GCTB+EOSL. Nas células tratadas isoladamente com gencitabina ou PP, verificaram-se menores taxas de apoptose, sugerindo a possibilidade de outro mecanismo de morte celular para essas células.

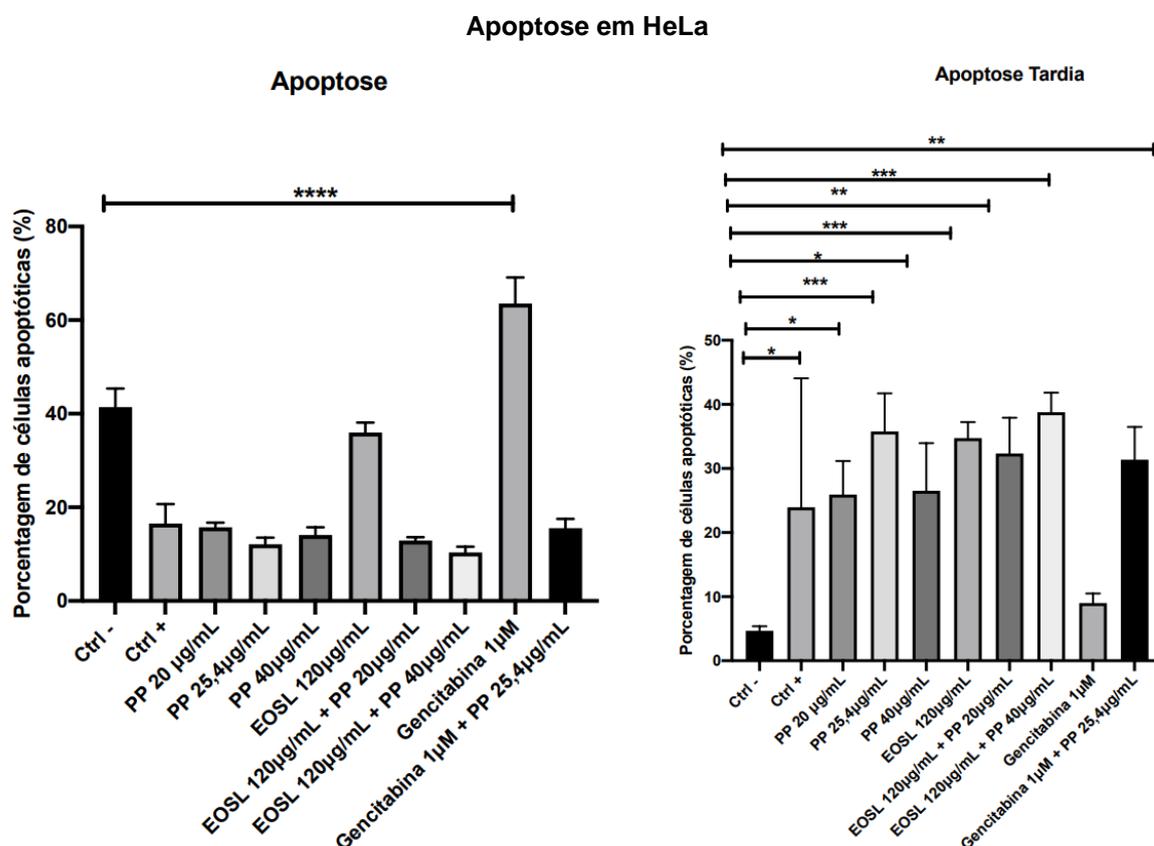


**Figura 22:** Gráfico dos eventos de apoptose inicial e tardia para cada uma das soluções testadas em SiHa. *One-way analysis of variance* (ANOVA) seguida por *Dunnett's pos-hoc test*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

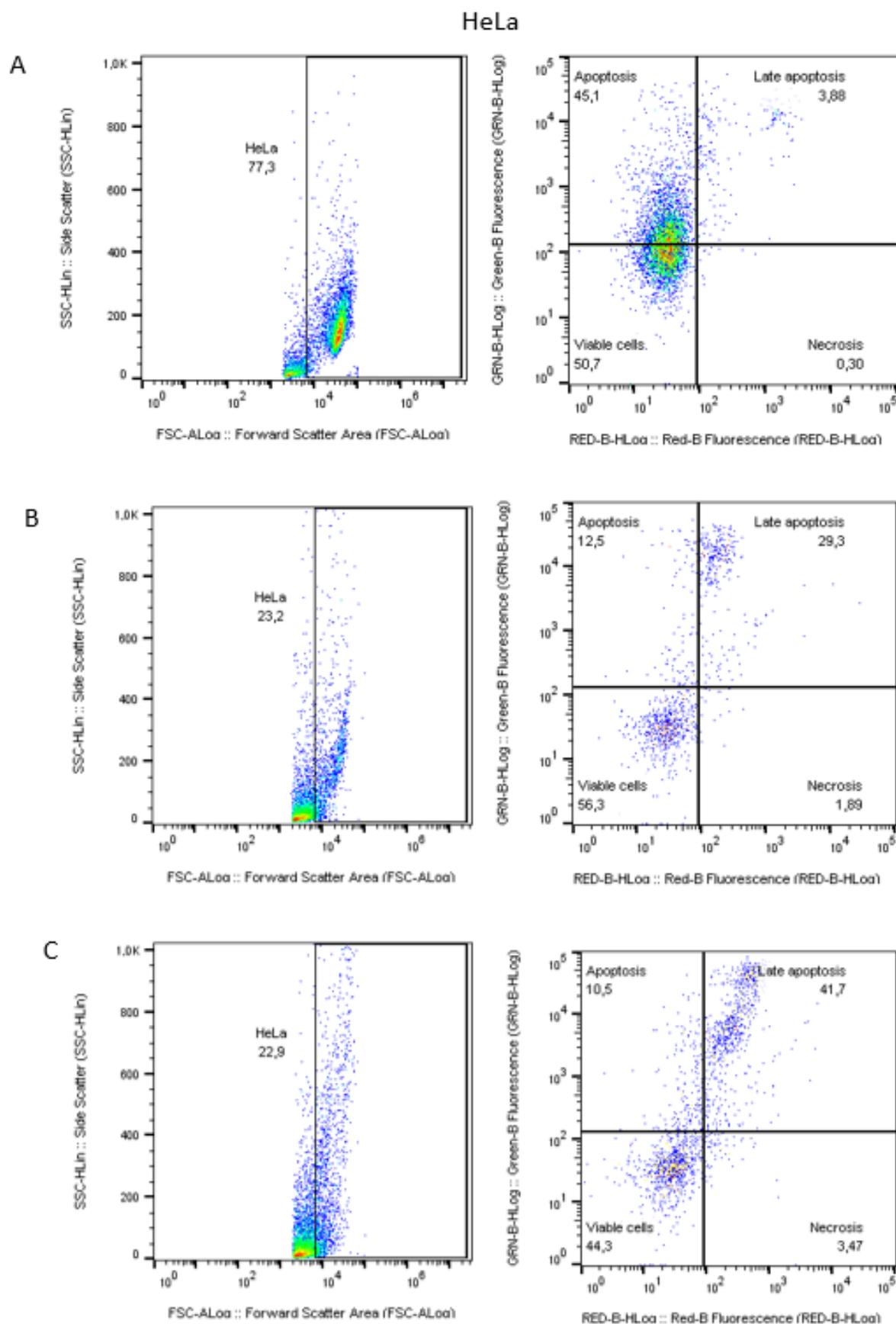


**Figura 23:** Imagens de citometria de fluxo no ensaio de Anexina V na linhagem SiHa, 72 horas após o tratamento com diferentes soluções. Em A, B e C observam-se imagens dos eventos identificados como apoptose inicial e tardia no controle negativo, PP na IC<sub>50</sub> e blenda EOSL-PP, respectivamente.

Na linhagem HeLa (**figuras 24 e 25**), só foi verificada taxa de apoptose inicial maior que o controle negativo nas células tratadas isoladamente com a gencitabina, com taxas de apoptose significativamente menores em todas as demais células. Com relação à apoptose tardia, não houve diferença significativa entre o controle negativo e as células tratadas com gencitabina, sugerindo a possibilidade de outro mecanismo de morte celular. As taxas de apoptose foram significativamente mais elevadas nas células tratadas com todas as demais soluções, tendo sido mais elevado naquelas tratadas com PP na IC<sub>50</sub>, EOSL 120 µg/mL e blenda PP-EOSL.



**Figura 24:** Gráfico dos eventos de apoptose inicial e tardia para cada uma das soluções testadas em HeLa. *One-way analysis of variance (ANOVA)* seguida por *Dunnett's pos-hoc test*. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



**Figura 25:** Imagens de citometria de fluxo no ensaio de Anexina V na linhagem HeLa, 72 horas após o tratamento com diferentes soluções. Em A, B e C observam-se imagens dos eventos identificados como apoptose inicial e tardia no controle negativo, PP na IC<sub>50</sub> e blenda EOSL-PP, respectivamente.

## 6. DISCUSSÃO

A maior parte dos trabalhos que se dedicam à *E. oleracea* tem como foco de estudo a polpa, na qual os polifenóis biologicamente ativos predominantes são as antocianinas – cianidina-3-glicosídeo e Cianidina-3-rutinosídeo (Pacheco-Palencia *et al*, 2009; Del-Pozo-Insfran *et al*, 2004; Lichtenthaler *et al*, 2005). Entretanto, as sementes representam 85% da massa total do fruto, descartadas na forma de rejeitos industriais (Ferreira *et al*, 2016). No estudo de Silva *et al* (2014) o extrato de semente de *E. oleracea* teve efeito mais relevante que o verificado com extratos preparados com as demais partes da planta; esses extratos foram testados em diferentes linhagens celulares, sendo verificado efeito citotóxico significativo apenas na linhagem tumoral MCF-7 (câncer de mama).

Através da caracterização química dos extratos de semente de *E. oleracea*, observou-se predomínio de polifenóis da família dos flavonoides, principalmente catequinas e procianidinas, similar ao verificado em outros estudos (Rodrigues *et al*, 2006; Barros *et al*, 2015, Oliveira *et al*, 2015). As catequinas são flavonoides com fortes propriedades antioxidantes (Cardoso *et al*, 2020). Portanto, estão relacionadas à eliminação de espécies reativas de oxigênio, inibição da formação de radicais livres e da peroxidação de lipídeos, tendo efeito relatado na prevenção de vários tipos de câncer (Filippini *et al*, 2020). As procianidinas são flavonoides de alto peso molecular, também com clara atividade antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória (Bagchi *et al*, 1997).

Embora as catequinas e procianidinas tenham sido os compostos predominantes nos extratos dos municípios de São Luís e Presidente Juscelino, verificaram-se diferenças quantitativas dessas substâncias nesses extratos. Foram identificados também alguns outros compostos em quantidades menores/traço, portanto, presumivelmente com menor potencial efeito biológico. Testagens preliminares realizadas nas etapas iniciais desta pesquisa (MTT – dados não mostrados) evidenciaram efeito proliferativo do EOJ, portanto sem interesse como quimioterápico. Por esse motivo, considerou-se conveniente realizar experimentação biológica de apenas um dos extratos de *E. oleracea* (EOSL).

A atividade antioxidante do extrato da semente de açaí já foi caracterizada em estudo prévio deste grupo (Silva *et al*, 2021). Observou-se que ocorre de maneira

concentração-dependente, com atividade máxima na concentração 500 µg/mL e concentração requerida para obter 50% da atividade antioxidante 61.8 µg/mL. Nesse estudo os autores observaram também redução da viabilidade celular, em linhagens de câncer de mama MCF-7, nas concentrações de extrato de 25 a 250 µg/mL.

Em nossa pesquisa, o efeito do extrato da semente de *E. oleracea* sobre a viabilidade celular das duas linhagens tumorais só foi significativo na concentração de 120 µg/mL. As alterações morfológicas das células tratadas com o EOSL foram discretas, menos evidentes que as produzidas pela gencitabina, com tendência a encolhimento celular, o que pode sinalizar perda do conteúdo citoplasmático (Silva *et al*, 2022).

Embora essa redução de viabilidade em linhagens neoplásicas de câncer cervical possa ter significado promissor, observou-se também redução na viabilidade celular de GM na concentração 120 µg/mL, após 72h de tratamento, resultado similar ao observado no estudo de Silva *et al* (2021). Convém ressaltar, entretanto, que o fato de o EOSL ter sido citotóxico tanto em linhagens neoplásicas quanto controles não exclui a possibilidade de uso do extrato com finalidade antineoplásica, uma vez que quimioterápicos padrões, em uso clínico, também têm variados efeitos citotóxicos em células normais. Além disso, mesmo que não sejam promissores como antineoplásicos isoladamente, após melhor elucidação dos mecanismos de morte envolvidos, podem ser usados em associação com quimioterápicos que se ligam especificamente a alguns alvos celulares (Ranjitkar *et al*, 2021).

Em nosso estudo, a citotoxicidade de gencitabina foi maior na linhagem GM ( $IC_{50} = 0,20 \pm 0,01$  µg/mL) que nas linhagens neoplásicas (HeLa e SiHa), nas quais não foi possível obter curva dose-resposta nas concentrações testadas. Nessas últimas, os efeitos mais significativos de inibição da viabilidade celular ocorreram a partir de 0,3 µg/mL, portanto, em uma concentração superior ao  $IC_{50}$  da GCTB na linhagem normal.

A gencitabina é um dos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer cervical, sendo considerado substituto da cisplatina, com evidências de mesma eficácia e menor toxicidade que aquele e sem o comprometimento de função renal conhecido nos fármacos derivados de platina; portanto, promissor para pacientes com comorbidades (Brau-Figueroa *et al*, 2022). Por tais motivos, foi selecionado como quimioterápico-padrão para as testagens em linhagens celulares, isoladamente ou em associação aos extratos. Embora seja um quimioterápico já em uso clínico, *in vitro*,

mostrou maior redução da viabilidade das linhagens normais que nas neoplásicas, em maneira concentração e tempo-dependente.

No que diz respeito ao extrato de casca de caule de *Geissospermum vellosii*, predominam os compostos da família dos alcaloides indólicos, caracterizados pela presença de um anel benzênico em sua estrutura química (Lima *et al*, 2009; Khaushit *et al*, 2013). Esses compostos também têm reconhecidas atividades antitumorais, antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticolinesterásicas etc., portanto, sendo promissores na pesquisa por antineoplásicos (Lima *et al*, 2009; Khaushit *et al*, 2013; Omar *et al*, 2021).

Em nosso estudo, os resultados mais promissores de citotoxicidade sobre células tumorais foram observados com uso do PP. Tanto em SiHa como em HeLa, o extrato reduziu significativamente a viabilidade celular, de maneira concentração e tempo-dependente. O efeito foi mais evidente em HeLa, já 24 horas após o tratamento; em GM também houve citotoxicidade significativa, porém com IC<sub>50</sub> substancialmente maior, embora tenha sido menor que o verificado para SiHa. Assim, chama a atenção o potencial desse extrato no câncer cervical relacionado ao HPV 18: caso confirmado por estudos *in vitro* adicionais e posteriores experimentos *in vivo*, seria possível utilizar uma baixa concentração, capaz de afetar as células neoplásicas, mas sem grande impacto nas células normais.

As alterações morfológicas mais significativas identificadas em nosso estudo também foram desencadeadas pelo extrato de *G. vellosii*. Observou-se redução significativa da área e perímetro das células. Esse extrato já mostrou potencial citotóxico *in vitro* em outras linhagens tumorais, como glioblastoma, câncer colorretal, de pâncreas, de ovários, entre outros (Beljanksi *et al*, 1993; Li *et al*, 2019; Dong, Chen, Chen, 2018; Chen, Dong, Chen, 2022).

Em nosso estudo, foram verificadas alterações de viabilidade e morfologia celulares, com maior potencial em inibir a formação de novas colônias de células verificado no extrato de *G. vellosii*. Convém ressaltar que, até o momento, só foram realizados ensaios clonogênicos para a linhagem SiHa, sendo necessário experimentos adicionais para investigar os efeitos sobre a linhagem HeLa.

Com relação aos mecanismos de morte celular, verificaram-se perfis diferentes entre as linhagens tumorais estudadas. Em HeLa houve predomínio significativo de eventos apoptóticos, enquanto na linhagem SiHa esse tipo de morte celular foi mais observado nas células tratadas com EOSL puro ou combinado ao PP ou gencitabina.

Esse resultado difere do encontrado por Silva *et al* (2021), na linhagem MCF-7, na qual não foram verificadas taxas significativas de apoptose. No estudo de Silva *et al* (2022), também com MCF-7, o extrato de semente de *E. oleracea* provocou morte celular por autofagia e, através das análises por microscopia óptica e eletrônica, os autores verificaram diminuição da área das células e surgimento de vesículas autofágicas.

Tanto na linhagem HeLa quanto SiHa, a gencitabina produziu baixa taxa de apoptose tardia, compatível com o mecanismo de ação já descrito para esse fármaco, induzindo morte celular por autofagia (Marchand *et al*, 2023). Quando a linhagem SiHa foi tratada com extrato de *G. vellosoi* isoladamente ou associado à gencitabina, não foi possível verificar aumento significativo da taxa de apoptose quando comparada ao controle. Isso pode levar à suspeição de outros mecanismos de morte celular envolvidos nessa linhagem celular, embora Chen, Dong e Chen (2022) tenham descrito a presença de apoptose para células tumorais de ovário. Portanto, é necessária a realização de experimentos adicionais nas linhagens de câncer cervical, a fim de verificar a presença de autofagia ou outros mecanismos.

Ao comparar os resultados encontrados para a linhagem SiHa no ensaio de viabilidade celular (MTT), clonogenicidade e morte celular, é possível supor, inicialmente, que os resultados sejam discrepantes entre si. Diante desse contexto e do fato de estudos prévios descreverem compostos do *G. vellosoi* com atividade antagonista nicotínica (Ribeiro, Souccar, Lappa, 1984) e dos efeitos desses receptores nos diferentes tipos de câncer, propõe-se a hipótese de que esse extrato poderia estar se ligando a esses receptores e, por meio dessa ligação, desencadeando alguns dos efeitos encontrados. Isso justificaria a redução na capacidade proliferativa das células verificada nos ensaios clonogênico e redução da sobrevivência celular verificada nos ensaios de MTT, de modo independente do observado para os ensaios de anexina, uma vez que esse último ensaio analisa uma via clássica e que, provavelmente, o composto em questão age por uma via envolvendo receptores nicotínicos, de maneira independente.

É conveniente compreender as principais diferenças entre as linhagens SiHa e HeLa para tentar explicar os diferentes efeitos dos extratos observados nessas linhagens e, deste modo, propor mecanismos de ação dessas substâncias. HeLa contém 10-50 cópias de DNA do HPV-18, enquanto SiHa contém 1-2 cópias do DNA do HPV-16 (Schwarz *et al.*, 1985; Baker *et al.*, 1987). Portanto, uma das possíveis

hipóteses seria de que essas diferentes sensibilidades aos extratos estariam relacionadas à sua interação com o material genético no interior das células, como no estudo de Su e Wu (1996), em que as diferentes supressões tumorais provocadas por adenovírus nessas linhagens deveram-se às interações do vírus com o material genético do HPV encontrado nessas duas linhagens tumorais.

É possível também que os efeitos diferenciais dos extratos estejam relacionados subunidades específicas de receptores nicotínicos, uma que já se sabe que HeLa e SiHa expressam algumas dessas subunidades de modo significativamente distinto, sobretudo as subunidades alfa-5 e beta-1 (Calleja-Macias, Kalantari, Bernard, 2009; Liu *et al*, 2019) e que já é conhecido o efeito anticolinesterásico do *G. vellosii* (Lima *et al*, 2009; Lima *et al*, 2020).

Por último, hipotetiza-se o papel das *smads* – família de proteínas criticamente importantes para a regulação e desenvolvimento celular e que representam os principais transdutores de sinal do TGF- $\beta$  – nessa resposta diferencial, uma vez que também estão diferencialmente expressas nessas duas linhagens tumorais. Maliekal, Anto e Karunagaran (2004) observaram que, embora HeLa e SiHa tenham sido altamente responsivas ao estímulo com TGF- $\beta$ , apenas na linhagem SiHa verificou-se ativação de *smads*, levando a parada no ciclo celular na fase G0/G1 e inibição de crescimento. Na linhagem HeLa, por outro lado, o estímulo com TGF- $\beta$  não levou a expressão dessas proteínas, resultando em progressão do ciclo celular e efeito proliferativo.

As hipóteses supracitadas poderão ser testadas em experimentos posteriores, através de estudos com técnicas de biologia molecular, como reação em cadeia de polimerase, para avaliação da expressão gênica, e *western blot*, para análise e quantificação das proteínas. Também poderão ser realizados ensaios para análise do ciclo celular, para compreender se os extratos interferem nas etapas desse ciclo.

Ressalta-se o ineditismo desta pesquisa, uma vez que não foram identificados outros trabalhos na literatura que avaliassem os efeitos dessas plantas em linhagens de câncer cervical. São necessárias mais pesquisas para a identificação de alvos moleculares e componentes de fitoquímicos com ação antineoplásica, no intuito de desenvolver um agente alternativo para prevenção e terapêutica do câncer cervical, podendo preencher a lacuna existente nas atuais opções terapêuticas disponíveis e seus efeitos indesejáveis.

Uma das principais inovações deste trabalho é o potencial dos extratos como adjuvantes no tratamento antineoplásico, uma vez que se verificou intensificação do efeito citotóxico da gencitabina quando associadas concentrações baixas de EOSL ou PP, sugerindo efeito adjuvante desses compostos. Após investigações adicionais, será possível utilizar modelos matemáticos para confirmar se os componentes nas blendas aumentam o efeito antitumoral por somação ou sinergismo, embora nossos dados sugiram esse último mecanismo. Em estudos futuros, espera-se que seja possível otimizar os efeitos dos quimioterápicos sem aumentar as doses utilizadas e, portanto, efeitos adversos dos mesmos, através da associação com esses extratos ou componentes vegetais.

## 7. CONCLUSÕES

O extrato de semente de *Euterpe oleracea* é rico em polifenóis da família dos flavonoides, tendo potencial para aproveitamento com diversos fins.

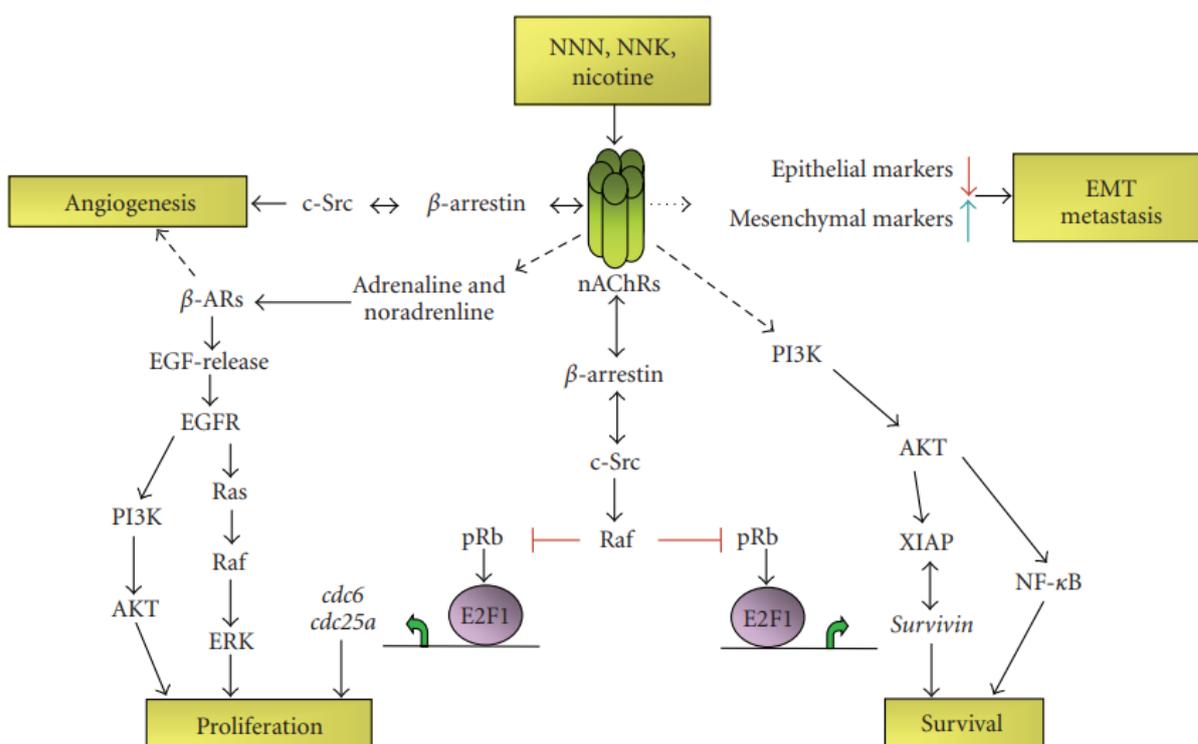
Tanto os extratos de *E. oleracea* como o de *Geissospermum vellosii* são fontes de fitoquímicos promissores para desenvolvimento de fármacos bioativos de efeito antitumoral, com importantes efeitos sobre a viabilidade e morfologia celulares e podendo levar à morte celular por apoptose. Esse potencial mostrou-se maior como adjuvantes antineoplásicos e na associação desses extratos entre si e a fármacos quimioterápicos para melhora de seu potencial antitumoral.

Dentre os extratos estudados, o de *G. vellosii* mostrou efeito mais significativo, de maneira concentração e tempo dependente e tendo efeito duradouro sobre a formação de novas colônias de células.

A presença de uma citotoxicidade não completamente seletiva indica a necessidade de identificação de alvos moleculares e melhor compreensão dos mecanismos de ação desses compostos.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma das mais intrigantes observações desta pesquisa foi, além dos significativos efeitos do extrato de *G. vellosii* e blends na viabilidade celular e clonogenicidade, a possibilidade de que esses efeitos seriam desencadeados não por apoptose, mas por vias envolvendo receptores nicotínicos de acetilcolina. A **figura 26** representa as vias ativadas pelo receptor nicotínico e onde provavelmente se daria a ligação e bloqueio pelo PP. Diante dos resultados deste trabalho, foi possível observar a redução da sobrevivência (no ensaio de MTT), proliferação celular e metástases (no ensaio de colônias).



**Figura 26:** Diversos eventos envolvidos na tumorigênese são mediados através de receptores nicotínicos de acetilcolina. Ao bloquear esse receptor, o extrato de *G. vellosii* seria capaz de impedir essas etapas e, portanto, reduzir a tumorigênese.

**Extraída de:** Singh, Pillal, Chellappan, 2011.

A elucidação acerca do envolvimento de receptores nicotínicos de acetilcolina nos mecanismos de ação desses extratos poderá ser realizada em ensaios posteriores, utilizando como controle positivo fármacos agonistas ou antagonistas seletivos de acetilcolina de atividade já amplamente caracterizada.

## REFERÊNCIAS

ALESSANDRA-PERINI, J. *et al.* Euterpe oleracea extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. BMC Complement Altern Med, v.2, n.18, p.116, 2018.

ALMEIDA, M.R. *et al.* Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? Brazilian Journal of Pharmacognosy 19(4): 942-952, Out./Dez. 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Global Cancer Facts & Figures 4th Edition. Atlanta: American Cancer Society; 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Key statistics for cervical cancer. [www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/about/key-statistics.html](http://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/about/key-statistics.html). [Acesso em 19.mai.2021].

AMERICAN CANCER SOCIETY. Treating Cervical Cancer. Disponível em: [cancer.org](http://cancer.org). [Acesso em 10.dez.2022].

BAGCHI, D. *et al.* Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1997; 95:179-189.

BAKER, C.C. *et al.* Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. (1987). J. Virol., 61, 962-971.

BARROS, L. *et al.* The powerful in vitro bioactivity of *Euterpe oleracea* Mart. seeds and related phenolic compounds. *Industrial Crops and Products* 76 (2015) 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.086>.

BELJANSKI, M; CROCHET, S; BELJANSKI, M.S. PB-100: A potent and selective inhibitor of human BCNU resistant glioblastoma cell multiplication. *Anticancer Res.* 1993, 13, 2301–2308.

BHATLA, N. *et al.* Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *FIGO Cancer Report* 2021. DOI: 10.1002/ijgo.13865.

BHATTACHARJEE, R. *et al.* Cellular landscaping of cisplatin resistance in cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 153 (2022) 113345. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113345>.

BOGANI, G. *et al.* Radical Hysterectomy for Early Stage Cervical Cancer. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 19, 11641. <https://doi.org/10.3390/ijerph191811641>.

BOLZANI, V.S. *et al.* 2012. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure and Applied Chemistry* 84: 1837-1846.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de câncer. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo de útero. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

BRAU-FIGUEROA, H. *et al.* Effectiveness of Concomitant Chemoradiotherapy with Gemcitabine in Locally Advanced Cervical Cancer Patients with Comorbidities. *Cancer Res Treat.* 2022;54(2):554-562. <https://doi.org/10.4143/crt.2021.375>.

BRAY, F. *et al.* Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca Cancer J Clin* 2018; 68:394–424.

BROUTET, N. *et al.* Comprehensive Cervical Cancer Control: A Guide to Essential Practice; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014; pp. 1–378.

CALLEJA-MACIAS, I. E.; KALANTARI, M.; BERNARD, H. U. Cholinergic signaling through nicotinic acetylcholine receptors stimulates the proliferation of cervical cancer cells: An explanation for the molecular role of tobacco smoking in cervical carcinogenesis? *Int. J. Cancer* 2009, 124, 1090–1096.

CAMARGO, M. R. M. *et al.* Composição química, etnofarmacologia e atividade biológica de espécies de *Geissospermum* Allemão (Apocynaceae Juss.). *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, Vol. 8(2): 73-160, Jul-Dez 2013.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Albert Einstein College of Medicine, Analytical Biological Services, *et al.* Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature* 2017; 543:378–84.

CARDOSO, R. R. *et al.* Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impact their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Res. Int.* 2020, 128, 108782.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Some older women are not getting recommended cervical cancer screenings. [www.cdc.gov/cancer/dcpc/research/articles/older-women-cervicalcancer-screenings.htm](http://www.cdc.gov/cancer/dcpc/research/articles/older-women-cervicalcancer-screenings.htm). [Acesso: 09.Dez.2022].

CHANDA, S. V.; KANERIA, M. J. 2012. Optimization of conditions for the extraction of antioxidants from leaves of *Syzygium cumini* L. using different solvents. *Food Anal. Methods* 5, 332–338.

CHEN, P.; DONG, R.; CHEN, Q. Extracts of the Medicinal Plants Pao Pereira and *Rauwolfia vomitoria* Inhibit Ovarian Cancer Stem Cells In Vitro. *Integrative Cancer Therapies*, 2022, Vol 21: 1–9. DOI: 10.1177/153473542211230.

COHEN, P. A. *et al.* Cervical cancer. *Lancet*. 2019;393(10167):169-182.

CHENG, Y. T.; YANG, C. C.; SHYUR, L. F. Phytomedicine-modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. *Pharmacol. Res*, v. 114, p. 128–143, 2016.

COTE, B. *et al.* (2015). Combinatorial resveratrol and quercetin polymeric micelles mitigate doxorubicin induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. *J. Control. Release* 213, 128–133. 10.1016/j.jconrel.2015.06.040.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) *J Agric Food Chem*. 2004 Mar 24;52(6):1539-45. doi: 10.1021/jf035189n.

DONG, R.; CHEN, P.; CHEN, Q. Extract of the Medicinal Plant Pao Pereira Inhibits Pancreatic Cancer Stem-Like Cell In Vitro and In Vivo. *Integrative Cancer Therapies* 17(4) 2018. <https://doi.org/10.1177/153473541878602>.

DOU, Q. P. Tea in Health and Disease. *Nutrients* 2019, 11, 929.  
doi:10.3390/nu11040929.

ECHEVERRY, S. M. *et al.* Optimization of flavonoid extraction from *Passiflora quadrangularis* leaves with sedative activity and evaluation of its stability under stress conditions. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Volume 28, Issue 5, September–October 2018, Pages 610-617. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.06.005>.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA (EMBRAPA). 2006. Sistema de Producao do Acai. Disponivel em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\\_2ed/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/index.htm)> Acesso em: 08 aug. 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAO. (2021). Strategic framework 2022-31. Rome: FAO. <http://www.fao.org/3/ne577en/ne577en.pdf>. (Accessed 20 April 2022).

FEITOSA, T. M. P.; ALMEIDA, R. T. Perfil de produção do exame citopatológico para controle do câncer do colo do útero em Minas Gerais, Brasil, em 2002. *Cad Saúde Publica* 2007; 23(4):907-917.

FERREIRA, D. S. *et al.* Antioxidant Capacity and Chemical Characterization of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Fruit Fractions. *Food Science and Technology* 4(5): 95-102, 2016. DOI: 10.13189/fst.2016.040502.

FILIPPINI, T. *et al.* Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Mar 2;3(3):CD005004.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance, *Oncogene* 31 (15) (2012) 1869–1883.

GODSWILL, A. C. Medicinal Plants: the medical, food, and nutritional biochemistry and uses. International Journal of Advanced Academic Research | Sciences, Technology and Engineering | Vol. 5, Issue 11 (November 2019).

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <http://controlecancer.bvs.br/>. Acesso em 23.out.2022.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>. Acesso em 28.nov.2022.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. Nat. Rev. Drug Discov. 14, 111–129 (2015).

KANG, J. *et al.* Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. Food Chem. 2011, 128, 152–157.

KAUSHIK, N. K. *et al.* Biomedical importance of indoles. Molecules 2013, 18, 6620–6662.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. Life Sci. 2007 July 26; 81(7): 519–533. doi:10.1016/j.lfs.2007.06.011.

KIM, Y. S. *et al.* Prospective randomized comparison of monthly fluorouracil and cisplatin versus weekly cisplatin concurrent with pelvic radiotherapy and high-dose rate brachytherapy for locally advanced cervical cancer. Gynecol Oncol. 2008; 108:195-200.

KOCHE, D.; SHIRSAT, R.; KAWALE, M. An overview of major classes of phytochemicals: their types and role in disease prevention. *Hislopia Journal* 9 (1/2) 2016, pp 1-11.

KOH, W. J. *et al.* NCCN Clinical Practice Guidelines In Oncology. Cervical Cancer, Version 3. 2019.

LEE, J. *et al.* Plant Extracts as Possible Agents for Sequela of Cancer Therapies and Cachexia. *Antioxidants* 2020, 9, 836.

LEI, J. *et al.* HPV Vaccination and the Risk of Invasive Cervical Cancer. *N Engl J Med* 2020; 383:1340-8. DOI: 10.1056/NEJMoa1917338.

LICHTENTHÄLER, R. *et al.* Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits. *Int J Food Sci Nutr.* 2005 Feb;56(1):53-64. doi: 10.1080/09637480500082082.

LI, J. M. *et al.* Flavopereirine Suppresses the Growth of Colorectal Cancer Cells through P53 Signaling Dependence. *Cancers* 2019, 11, 1034; doi:10.3390/cancers11071034.

LIMA, C. P. *et al.* Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 14, n. 2, p. 321-326, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000200011>.

LIMA, J. A. *et al.* *Geissospermum vellosii* stem bark anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 92 (2009) 508–513.

LIMA, J. A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a *Geissospermum vellosii* stem bark fraction. *An Acad Bras Cienc* (2016). DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140374>.

LIMA, J. A. *et al.* Geissoschizoline, a promising alkaloid for Alzheimer's disease: Inhibition of human cholinesterases, anti-inflammatory effects and molecular docking. *Bioorganic Chemistry* 104 (2020) 104215. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104215>.

LIU, Y. *et al.* Cervical Cancer Correlates with the Differential Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptors and Reveal Therapeutic Targets. *Mar. Drugs* 2019, 17, 256; doi:10.3390/md17050256.

LUO, M. L. *et al.* Advances in indole-containing alkaloids as potential anticancer agents by regulating autophagy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 149 (2022) 112827. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112827>.

MARANHO, A. S.; PAIVA, A. V. Produção de mudas de *Physocalymma scaberrimum* em substratos compostos por diferentes porcentagens de resíduo orgânico de açaí. *Revista Floresta*, Curitiba, PR, v. 42, n. 2, p. 399 - 408, abr./jun. 2012.

MARCHAND, B. *et al.* Gemcitabine promotes autophagy and lysosomal function through ERK- and TFEB-dependent mechanisms. *Cell Death Discovery* (2023) 9:45. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01342-z>.

MARTH, C. *et al.* Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 28 (Supplement 4): iv72–iv83, 2017 doi:10.1093/annonc/mdx220.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Functional Foods in Health and Disease* 2015, 5:209-223.

MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. Incidence, mortality and risk factors of cervical cancer in the world. *Biomed Res Ther.* 2017; 4(12):1795-1811.

MOMTAZI-BOROJENI, A. A. *et al.* Anti-Cancer and Radio-Sensitizing Effects of Curcumin in Nasopharyngeal Carcinoma. *Curr. Pharm. Des.* 2018, 24, 2121–2128.

NASCIMENTO, R. J. S. *et al.* Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 2, p. 498-502, 2008.

NASREEN, S. *et al.* Etiology of hepatocellular carcinoma and treatment through medicinal plants: A comprehensive review. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 2018, 18, 187–197.

NEVES, L. T. B. C. *et al.* Quality of fruits manually processed of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 3, p. 729-738, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 770–803. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

NUNES DE ARRUDA, F. *et al.* Quality of life of locally advanced cervical cancer patients after neoadjuvant chemotherapy followed by chemoradiation versus

chemoradiation alone (CIRCE trial): a randomized phase II trial. *Int J Gynecol Cancer* 2020;30:749–756. doi:10.1136/ijgc-2019-001134.

OKUNADE, K. S. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *J Obstet Gynaecol.* 2020 July; 40(5): 602–608. doi:10.1080/01443615.2019.1634030.

OLIVEIRA, P. R. B. *et al.* Euterpe oleracea Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. *PLoS One.* 2015 Dec 2;10(12):e0143721. doi: 10.1371/journal.pone.0143721.

OMAR, F. *et al.* Plant-Based Indole Alkaloids: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Molecules* 2021, 26, 2297. <https://doi.org/10.3390/molecules26082297>.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. OPAS. Câncer. 2018. Disp:< [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article)>.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food Chemistry.* Vol 115, Issue 4, 15 August 2009, Pages 1199-1205.

PARK, S.H. *et al.* Therapeutic Potential of Natural Products in Treatment of Cervical Cancer: A Review. *Nutrients* 2021, 13, 154. <https://doi.org/10.3390/nu13010154>.

PEARSON, H. E. *et al.* Overcoming resistance to cetuximab with honokiol, a small-molecule polyphenol. *Mol. Cancer Ther* 2017, 17, 204–214.

PIO CORRÊA, M. 1984. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Brasília: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.

RAMOS, P.; HERRERA, R.; MOYA-LEÓN, M. A. 2014. Anthocyanins: food sources and benefits to consumer's health. Handbook of Anthocyanins. (pp.373-394): Nova Science Publishers, Inc. Editors: Leah M. Warner.

RANJITKAR, S. *et al.* Cytotoxic effects on cancerous and non-cancerous cells of trans-cinnamaldehyde, carvacrol, and eugenol. Scientific Reports (2021) 11:16281. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95394-9>.

RERUCHA, C. M.; CARO, R. J.; WHEELER, V. L. Cervical cancer screening. Am Fam Physician. 2018;97(7):441-448.

ROCHA, A. P. M. *et al.* Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. Vascul Pharmacol. 2007 Feb;46(2):97-104. doi: 10.1016/j.vph.2006.08.411.

RODRIGUES, R. B. *et al.* Total oxidant scavenging capacity of Euterpe oleracea Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. J Agric Food Chem. 54, 4162–7, 2006.

ROGEZ, H. Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação, 1st ed.; UFPA: Belém, Brazil, 2000.

SCHWARZ, E. *et al.* Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. (1985). Nature, 314, 111 – 11.

SCHIFFMAN, M. *et al.* Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2.

SEERAM, N. P. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *Journal of agricultural and food chemistry*, Washington, v. 56, n. 3, p. 630-635, Feb. 13, 2008.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; WAGLE, N. S. Cancer Statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.*2023;73:17–48. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.

SILVA, D. F. *et al.* Cytotoxic effects of *Euterpe oleracea* Mart. in malignant cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, 14:175.  
<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/175>.

SILVA, M. A. C. N. *et al.* Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract induces ROS production and cell death in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Molecules*. 2021 Jun 10;26(12):3546.

SILVA, M. A. C. N. *et al.* (2022): Ultrastructural changes induced by açai (*Euterpe oleracea* Mart) in MCF-7 breast cancer cell line, *Ultrastructural Pathology*, DOI: 10.1080/01913123.2022.2141404.

SILVA, R. C. *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed flour prevents obesity-induced hepatic steatosis regulating lipid metabolism by increasing cholesterol excretion in high-fat diet-fed mice. *Food Res Int.* 2018 Sep;111:408-415. doi: 10.1016/j.foodres.2018.05.043.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer Journal for Clinicians*. Hoboken, v. 71, n. 3, p. 209-249, Feb. 2021. DOI 10.3322/caac.21660.

TINOCO, A. C. Açaí amazônico: novas perspectivas de negócio. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. 1 CD-ROM. Trabalho apresentado no Workshop Regional do Açaizeiro: pesquisa, produção e comercialização, Belém, PA, 2005.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA approves expanded use of Gardasil 9 to include individuals 27 through 45 years old. [www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-expanded-use-gardasil-9-include-individuals-27-through-45-years-old](http://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-expanded-use-gardasil-9-include-individuals-27-through-45-years-old). [Acesso 10.Dez.2022].

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *An Acad Bras Cienc* (2018) 90 (1 Suppl.1). <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>.

VAN MEURS, H. *et al.* Frequency of pelvic lymph node metastases and parametrial involvement in stage IA2 cervical cancer: a population-based study and literature review. *Int J Gynecol Cancer*. 2009; 19:21-26.

WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. *Cancer Research*, Chicago, v.45, n. 1, p.1–8, Jan. 1985.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART B. W. (ed.) *World cancer report: cancer research for cancer prevention*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586>. Acesso em: 19 set. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. International agency for research on Cancer. IARC. World Cancer Report 2014. Edited by Bernard W. Stewart and Christopher P. Wild. Lyon. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. 2017. Disponível em:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

YANG, C. S. *et al.* Cancer prevention by tea: Animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9, 429–439.

ZEFERINO, L.C. *et al.* Guidelines for HPV-DNA Testing for Cervical Cancer Screening in Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2018; 40:360–368. DOI <https://doi.org/10.1055/s-0038-1657754>. ISSN 0100-7203S.