

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

ADEGILDO ROLIM DE ABREU JUNIOR

POTENCIAL ANTITUMORAL DE *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae)
EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL

João Pessoa – PB
2025

ADEGILDO ROLIM DE ABREU JUNIOR

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae)
EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves

João Pessoa – PB

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A162p Abreu Junior, Adegildo Rolim.
Potencial antitumoral de *Annona vepretorum* Mart.
(Annonaceae) em células de câncer colorretal / Adegildo
Rolim Abreu Junior. - João Pessoa, 2025.
113 f. : il.

Orientação: Juan Carlos Ramos Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais - Câncer colorretal. 2.
Farmacologia. 3. Apoptose. 4. Estresse oxidativo. I.
Gonçalves, Juan Carlos Ramos. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9:616-006.6(043)

ADEGILDO ROLIM DE ABREU JUNIOR

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae)
EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL**

APROVADO EM: 14/04/2025

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves

Orientador/Presidente – Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras (DCF/UFPB)

Membro interno – Universidade Federal da Paraíba

Prof^a. Dr^a. Gláucia Veríssimo Faheina Martins (DBM/UFPB)

Membro externo – Universidade Federal da Paraíba

À minha avó materna (*in
memoriam*) Aparecida,
à minha mãe Luciana e
à minha irmã Nathalie,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, expresso minha profunda gratidão à minha família, em especial à minha mãe, Luciana, que sempre incentivou minha educação e me ensinou o valor do conhecimento. Este título é fruto do seu esforço e dedicação comigo, obrigado. À minha irmã, Nathalie, e ao meu pai, Adegildo, por serem minha base de apoio e incentivo durante toda a minha trajetória acadêmica.

À minha segunda mãe, minha amada avó materna Aparecida (*in memoriam*), cujo maior sonho era ver os seus netos formados. Hoje, dou continuidade a esse sonho. Jamais esquecerei tudo o que ela fez por mim e os valiosos ensinamentos que levarei comigo pelo resto da minha vida.

Aos meus amigos inseparáveis da graduação, que hoje continuam comigo na pós-graduação: Moisés, Alissa e Myllena. Agradeço imensamente por sempre estarem presente ao meu lado nos bons e nos maus momentos, ouvindo os meus desabafos e me aconselhando sempre. Obrigado por terem tornado cada instante, dentro e fora da sala de aula, repleto de risos e alegria, criamos memórias inesquecíveis.

Ao Laboratório de Oncofarmacologia, por ter sido a primeira porta aberta para mim há tantos anos. Agradeço à coordenadora Profa. Dra. Marianna Sobral, pelo acolhimento e todos os ensinamentos científicos. Igualmente, agradeço a toda equipe ONCOFAR pelo companheirismo, carinho e apoio mútuo, em especial a: Moisés, Ramon, Karinne, Paulo, Ana Paula, Rafael, Geovana, Sâmia, Valgrícia, Mariana, Isione, Heivila, Érika, Pablo, Isabela, Patricianny, Victor Hugo e Gabi.

Aos meus outros amigos, John, Anderson, Jorge, Lucas, Francielle, entre outros, que foram um apoio emocional durante toda essa trajetória, obrigado por me apoiarem e por me escutarem quando eu mais precisei.

Agradeço ao meu orientador, o Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves, pela oportunidade inicial de ingressar na pesquisa científica há seis anos, e por toda sua orientação ao longo da realização desta dissertação. Tenho plena certeza de que todos os ensinamentos que me proporcionou serão levados comigo por toda a minha vida, contribuindo para minha formação como farmacêutico, pesquisador e como um futuro membro do mundo acadêmico.

À Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins e ao Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras por terem aceitado o convite de participar da minha banca avaliadora. Também expresso minha gratidão aos suplentes Profa. Dra. Islânia Giselia Albuquerque Gonçalves e ao Prof. Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior. Obrigado pelo carinho, disponibilização e contribuições para aprimorar este trabalho.

Agradeço a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por ter sido minha segunda casa durante todos esses anos. Também sou grato ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) pela oportunidade concedida.

Finalmente, agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de auxílio financeiro, que me ajudou a desenvolver este trabalho.

ABREU JUNIOR, A. R. **POTENCIAL ANTITUMORAL DE *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL.** 2025. 114f. **Dissertação** (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado no mundo e o segundo mais letal. Aliado a isso, a terapia atual enfrenta desafios significativos incluindo a baixa seletividade, toxicidade, efeitos adversos e resistência aos medicamentos, justificando a busca por novos fármacos. Nesse contexto, os produtos naturais fornecem uma rica fonte de compostos bioativos com propriedades anticancerígenas. A planta *Annona vepretorum* Mart., conhecida como “pinha da Caatinga”, é uma espécie endêmica do nordeste brasileiro. Seus derivados vegetais apresentam efeitos citotóxicos descritos na literatura, mas não elucidados. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do extrato éter de petróleo obtido a partir das cascas do caule de *Annona vepretorum* (EEP-Av). A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio do brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), frente a linhagens de células tumorais humanas (HCT 116, HT-29, SK-MEL-28, MCF-7 e LoVo) e linhagem celular humana não tumoral de indivíduo sadio (HaCaT). Após 72 h de tratamento, a linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT 116 foi a mais sensível ao EEP-Av (CI_{50} : $15,49 \pm 2,28 \mu\text{g/mL}$), não apresentando diferença significativa com a CI_{50} de 48 h ($14,66 \pm 3,49 \mu\text{g/mL}$), sendo escolhida para dar continuidade aos experimentos. Somado a isso, o extrato foi mais seletivo nessas células tumorais em 48 h (Índice de seletividade – IS: 5,84) do que no tempo de 72 h (IS: 5,0), em relação à atividade em HaCaT (CI_{50} 72 h: $77,55 \pm 2,50 \mu\text{g/mL}$ / CI_{50} 48 h: $85,62 \pm 2,42 \mu\text{g/mL}$). Em comparação, após 48 h, o controle positivo doxorrubicina (DXR) foi mais citotóxico em células HaCaT (CI_{50} : $0,64 \pm 0,98 \mu\text{M}$) do que em HCT 116 (CI_{50} : $4,30 \pm 0,99 \mu\text{M}$), com IS de 0,14. Portanto, o EEP-Av apresentou 41,71 vezes mais seletividade que a DXR. A análise do tipo de morte celular (apoptose/necrose) por marcação com laranja de acridina/iodeto de propídio (LA/IP), mostrou que o EEP-Av induziu apoptose em células HCT 116, apresentando características como formação de *blebs* de membrana e alterações nucleares, confirmadas pelo ensaio com marcação de Hoechst 34580. Na investigação de alteração mitocondrial por JC-1, foi observado que o extrato causou a perda do potencial de membrana mitocondrial, inferindo a participação da via intrínseca de apoptose em seu mecanismo. Em sequência, no estudo de modulação do estado redox, observou-se que EEP-Av induziu aumento dos níveis de EROs, parcialmente revertido por pré-tratamento com N-Acetilcisteína (NAC). Portanto, o estudo realizado sugere que EEP-Av induz morte celular em linhagem de adenocarcinoma colorretal humano (HCT 116), de forma seletiva, por meio da modulação da via intrínseca da apoptose e indução de estresse oxidativo.

Palavras-chave: Produtos naturais; Câncer; Farmacologia; Apoptose; Estresse oxidativo.

ABREU JUNIOR, A. R. **ANTITUMOR POTENTIAL OF *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) IN COLORECTAL CANCER CELLS.** 2025. 114p. Master's thesis (Master's in Natural and Synthetic Bioactive Products) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most diagnosed cancer worldwide and the second most lethal. In addition, current therapy faces significant challenges, including low selectivity, toxicity, adverse effects, and drug resistance, justifying the search for new drugs. In this context, natural products provide a rich source of bioactive compounds with anticancer properties. The plant *Annona vepretorum* Mart., known as "pinha da Caatinga," is an endemic species of the Brazilian Northeast. Its plant derivatives have cytotoxic effects described in the literature but not yet elucidated. Given this, the objective of this study was to evaluate the in vitro antitumor activity of the petroleum ether extract obtained from the stem bark of *Annona vepretorum* (EEP-Av). Cytotoxicity was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay against human tumor cell lines (HCT 116, HT-29, SK-MEL-28, MCF-7, and LoVo) and a non-tumor human cell line from a healthy individual (HaCaT). After 72 h of treatment, the HCT 116 colorectal adenocarcinoma cell line was the most sensitive to EEP-Av (IC_{50} : $15.49 \pm 2.28 \mu\text{g/mL}$), with no significant difference compared to the IC_{50} at 48 h ($14.66 \pm 3.49 \mu\text{g/mL}$), and was selected for further experiments. Additionally, the extract was more selective for these tumor cells at 48 h (Selectivity Index – SI: 5.84) than at 72 h (SI: 5.0), relative to its activity in HaCaT cells (IC_{50} 72 h: $77.55 \pm 2.50 \mu\text{g/mL}$ / IC_{50} 48 h: $85.62 \pm 2.42 \mu\text{g/mL}$). In comparison, after 48 h, the positive control doxorubicin (DXR) was more cytotoxic to HaCaT cells (IC_{50} : $0.64 \pm 0.98 \mu\text{M}$) than to HCT 116 cells (IC_{50} : $4.30 \pm 0.99 \mu\text{M}$), with an SI of 0.14. Therefore, EEP-Av was 41.71 times more selective than DXR. Cell death type analysis (apoptosis/necrosis) using acridine orange/propidium iodide (AO/PI) staining showed that EEP-Av induced apoptosis in HCT 116 cells, displaying characteristics such as membrane blebbing and nuclear alterations, confirmed by Hoechst 34580 staining. In the mitochondrial alteration investigation using JC-1, the extract caused a loss of mitochondrial membrane potential, suggesting the involvement of the intrinsic apoptosis pathway in its mechanism. Furthermore, in the redox state modulation study, EEP-Av increased ROS levels, which were partially reversed by pretreatment with N-acetylcysteine (NAC). Therefore, this study suggests that EEP-Av selectively induces cell death in human colorectal adenocarcinoma cells (HCT 116) through modulation of the intrinsic apoptosis pathway and oxidative stress induction.

Keywords: Natural products; Cancer; Pharmacology; Apoptosis; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da carcinogênese e microambiente tumoral.....	24
Figura 2. Marcas biológicas (“hallmarks”) do câncer.....	26
Figura 3. Via extrínseca e intrínseca da apoptose.....	28
Figura 4. Consequências dos diferentes níveis de espécies reativas de oxigênio.....	31
Figura 5. Progressão da carcinogênese do câncer colorretal.....	34
Figura 6. Planta e o fruto da espécie <i>Annona vepretorum</i> Mart.....	42
Figura 7. Estrutura química do diterpeno ent-3 β -hidroxi-caur-16-eno.....	43
Figura 8. Citotoxicidade do EEP-Av frente a linhagens celulares de câncer colorretal humano (LoVo, HT-29 e HCT 116) após 72 h de tratamento.....	61
Figura 9. Citotoxicidade do EEP-Av frente a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (HCT 116) após 24 e 48 h de tratamento.....	62
Figura 10. Curvas concentração-resposta de diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72 h) com variadas concentrações do EEP-Av em células HCT 116.....	63
Figura 11. Citotoxicidade do EEP-Av frente a linhagem celular humana de queratinócitos sadios (HaCaT) após 24, 48 e 72 h de tratamento.....	64
Figura 12. Citotoxicidade de DXR frente as linhagens celulares humanas de adenocarcinoma colorretal (HCT 116) e queratinócitos sadios (HaCaT) após 48 h de tratamento.....	66
Figura 13. Efeito inibitório do EEP-Av na formação de colônias de células de adenocarcinoma colorretal humano (HCT 116)	67
Figura 14. Fotomicrografias representativas da avaliação de apoptose/necrose do EEP-Av e DXR em células HCT 116, marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) e observadas em microscopia confocal após 48 h.....	69
Figura 15. Fotomicrografias de microscopia confocal das alterações morfológicas do processo de morte apoptótica em células HCT 116, marcadas	

com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) após tratamento por 48 h com EEP-Av e DXR.....	70
Figura 16. Percentual de células HCT 116 marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) em diferentes estágios morfológicos após tratamento por 48 h com EEP-Av e DXR.....	71
Figura 17. Fotomicrografias representativas das alterações nucleares induzidas por EEP-Av e DXR em células HCT 116, marcadas com Hoechst 34580 e observadas em microscopia confocal após 48 h.....	72
Figura 18. Percentual de fluorescência de células HCT 116 após 48 h de exposição ao EEP-Av e DXR e marcadas com Hoechst 34580.....	73
Figura 19. Fotomicrografias representativas da avaliação do potencial de membrana mitocondrial de células HCT 116 tratadas com EEP-Av e CCCP por 48 h e marcadas com JC-1.....	74
Figura 20. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de células HCT 116 após 48 h de exposição ao EEP-Av e CCCP e marcação com JC-1.....	75
Figura 21. Citotoxicidade do EEP-Av em células HCT 116 após 48 h de tratamento com EEP-Av e DXR, na ausência ou presença de N-acetilcisteína (NAC)	76
Figura 22. Mecanismo de ação do extrato éter de petróleo das cascas do caule de <i>Annona vepretorum</i> Mart. (EEP-Av) em células HCT 116.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Triagem de efeito citotóxico do EEP-Av frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas após 72 h de tratamento.....	59
Tabela 2. Valores de CI_{50} e IS do EEP-Av em linhagens celulares tumorais de câncer colorretal (HCT 116, HT-29 e LoVo) e não tumoral HaCaT no período de 24, 48 e/ou 72 h de tratamento.....	65
Tabela 3. Valores de CI_{50} e IS de DXR em linhagem celular tumoral HCT 116 e não tumoral HaCaT no período de 48 h de tratamento.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição fitoquímica das cascas do caule de <i>Annona</i> <i>vepretorum</i>	44
Quadro 2. Linhagens de células tumorais e não tumoral utilizadas no estudo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
AcM	Anticorpos monoclonais
ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	Fator 1 de ativação da protease de apoptose
APC	Gene <i>adenomatous polyposis coli</i>
BAK	Proteína antagonista/killer Bcl-2
BAX	Proteína X Associada ao Bcl-2
Bcl-2	Proteína linfoma de células B2
BID/tBID	Agonista da morte com domínio de interação BH3/BID truncado
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
CCCP	Cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona
CCR	Câncer colorretal
CI₅₀	50% da concentração inibitória máxima
CIN	Instabilidade cromossômica
CpG	Dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina
CTLA-4	Antígeno-4 relacionado ao linfócito T citotóxico
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DCC	gene do receptor de netrina-1
DMEM	Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EEP-Av	Extrato éter de petróleo de <i>Annona vepretorum</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPM	Erro padrão da média
ERK	Proteína cinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FADD	Domínio de morte associado a Fas

FAP	Polipose adenomatosa familiar
Fas/FasL	Receptor de morte de superfície celular/ ligante de receptor Fas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Proteína Fos
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>
HCT 116	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
hMLH1	Gene homólogo humano da proteína MutL 1
HT-29	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
IARC	<i>International Agency for Research of Cancer</i>
IDH	Índice de desenvolvimento humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de propídio
IS	Índice de seletividade
JC-1	Cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
JUN	Proteína Jun
KRAS	Oncogene homólogo ao sarcoma de ratos de Kirsten
LA	Laranja de acridina
LoVo	Linhagem de adenocarcinoma metastático colorretal humano
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MMR	Sistema de reparo de incompatibilidades de DNA
mRNA	Micro ácido ribonucleico
MSI	Instabilidade de microssatélites
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetililiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
Myc	Fator de transcrição Myc
NAC	N-acetilcisteína
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	Proteína P53
PBS	Solução tampão fostato

PD-1	Receptor de morte programada 1
PKB/AKT	Proteína cinase B
PMEM	Permeabilidade da membrana mitocondrial externa
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
RAS	Proteína Rat Sarcoma vírus
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro bovino fetal
SDS-HCl	Dodecil sulfato de sódio/Ácido clorídrico
SIH/SUS	Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma humano
SMAC	Ativador de Caspases Derivado da Mitocôndria 2
TNFR/TNF	Receptor do fator de necrose tumoral/Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
UV	Radiação ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
XIAP	proteína de apoptose ligado ao X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1 Aspectos gerais do câncer.....	22
2.2 Apoptose.....	26
2.3 Estresse oxidativo no câncer.....	30
2.4 Câncer colorretal.....	33
2.5 Tratamento do câncer colorretal.....	37
2.6 Produtos naturais e derivados sintéticos no tratamento do câncer.....	39
2.7 <i>Annona vepretorum</i> e o seu potencial farmacológico.....	41
3 OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo geral.....	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Local da pesquisa.....	49
4.2 Material botânico.....	49
4.3 Preparo das amostras.....	49
4.4 Substâncias e reagentes.....	50
4.5 Equipamentos	50
4.6 Linhagens celulares e cultivo.....	51
4.7 Avaliação de citotoxicidade do EEP-Av em linhagens tumorais e não tumoral e determinação do Índice de Seletividade (IS)	52
4.8 Avaliação da capacidade de formação de colônias do EEP-Av.....	53
4.9 Investigação de mecanismos de ação antitumoral <i>in vitro</i> induzida por EEP-Av.....	54
4.9.1 Avaliação de morte celular por microscopia confocal com marcação de laranja de acridina e iodeto de propídio (LA/IP)	54
4.9.2 Análise de alterações nucleares por coloração de Hoechst.....	55
4.9.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	55
4.9.4 Investigação do envolvimento de ERO no mecanismo do EEP-Av.....	56
4.10 Análise estatística.....	57
5 RESULTADOS.....	59

5.1 Citotoxicidade do EEP-Av em linhagens de células humanas tumorais e não tumorais.....	59
5.2 Efeito do EEP-Av na formação de colônias de células HCT 116.....	67
5.3 Tipo de morte celular induzida por EEP-Av em células HCT 116, avaliada por dupla marcação de laranja de acridina e iodeto de propídio.....	68
5.4 Alterações nucleares promovidas por EEP-Av em HCT 116 coradas com Hoechst 34580.....	71
5.5 Efeito do EEP-Av no potencial de membrana mitocondrial de células HCT 116 marcadas com JC-1.....	73
5.6 Citotoxicidade por estresse oxidativo induzido por EEP-Av e DXR em células HCT 116 na presença ou ausência de NAC.....	75
6 DISCUSSÃO.....	79
7 CONCLUSÕES.....	89
8 PERSPECTIVAS.....	90
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXOS.....	110

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é resultado de um processo de alterações genéticas e/ou epigenéticas acumulativas em células, que resultam em condições fenotípicas que diferem de tecidos saudáveis, como o crescimento celular descontrolado e a resistência à apoptose (Ravi *et al.*, 2022; Hanahan, 2022). Considerando apenas o câncer colorretal (CCR), em 2022 foram registrados cerca de 2 milhões de novos casos e 1 milhão de óbitos a nível global, tornando-o o terceiro tipo da doença mais diagnosticado, com exceção ao câncer de pele não melanoma, e o segundo mais letal (Bray *et al.*, 2024).

Entre as principais modalidades terapêuticas disponíveis para o tratamento do CCR estão a ressecção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e terapia alvo (Krasteva; Georgieva, 2022). Os agentes quimioterápicos utilizados na clínica para tratar o CCR são o 5-fluorouracil, oxaliplatina, irinotecano e capecitabina (Hossain *et al.*, 2022). Embora apresentem eficácia clínica, estes não são seletivos às células tumorais, resultando em toxicidade que, somado a resistência aos fármacos, limita a terapêutica e justifica a busca por novas abordagens com menor toxicidade, visando ampliar o arsenal terapêutico (Zeien *et al.*, 2022).

Nesse contexto, os produtos naturais são um grupo de materiais e substâncias obtidas de fontes como as plantas medicinais, que fornecem compostos bioativos com propriedades farmacológicas como anticancerígena (Dutta *et al.*, 2019). De fato, mais de 75% dos agentes antitumorais aprovados pelo FDA derivam de produtos naturais ou de seus análogos sintéticos, incluindo o paclitaxel, etoposídeo, teniposídeo, vincristina, vimblastina, docetaxel, topotecano, irinotecano, entre outros (Newman; Cragg, 2020).

O Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo, com mais de 8,5 milhões de plantas e animais, representando um enorme potencial para a descoberta de novos produtos naturais com possíveis aplicações terapêuticas (Calixto, 2019).

Sob essa perspectiva, encontra-se a família Annonaceae, constituída por mais de 120 gêneros compostos por 2.400 espécies de árvores, arbustos e lianas distribuídas por florestas tropicais pelo globo (Chatrou *et al.*, 2012; Teles

et al., 2015). No Brasil é expressivo o número de espécies do gênero *Annona* L., muitas delas são nativas ou endêmicas do país (Almeida et al., 2014).

A espécie *Annona vepretorum* Mart., conhecida popularmente como “pinha da Caatinga”, é endêmica do bioma Caatinga no nordeste brasileiro, apreciada pelos seus frutos que são consumidos como fonte nutricional ou para fins terapêuticos (Araújo et al., 2015). Investigações anteriores demonstraram que derivados vegetais dessa espécie, como extratos e óleos essenciais, exibem propriedades farmacológicas como antimicrobiana (Costa et al., 2012), antioxidante (Almeida et al., 2014), anti-inflamatória, antinociceptiva (Silva et al., 2015), anticonvulsivante, sedativa, ansiolítica, antidepressiva (Diniz et al., 2019), citotóxica (Bonfim et al., 2016), entre outras.

Estudos anteriores evidenciaram o potencial citotóxico *in vitro* de derivados vegetais de *A. vepretorum*. O óleo essencial obtido das folhas da planta foi eficaz contra células de melanoma murino, carcinoma hepatocelular e de leucemias (Bonfim et al., 2016). Os extratos metanólico e clorofórmico das folhas também exibiram alta citotoxicidade, em células de câncer de cólon e sarcoma murino (Silva et al., 2017).

Contudo, apesar do notável potencial farmacológico e anticancerígeno de *A. vepretorum*, os mecanismos antitumorais ainda não foram elucidados. Portanto, este trabalho objetivou avaliar o efeito citotóxico do extrato éter de petróleo obtido das cascas do caule de *Annona vepretorum* Mart., frente a linhagens de células humanas tumorais e sadia, bem como investigar o mecanismo de ação antitumoral na linhagem mais promissora.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do câncer

As etapas de crescimento celular, período em que há aumento de massa e tamanho das células, e de divisão celular, onde uma célula-mãe da origem a duas células filhas geneticamente idênticas por meio do mecanismo conhecido como mitose, são componentes da proliferação celular, um processo caracterizado por elevação no número de células que é essencial para o desenvolvimento, reparo, regeneração e estabilidade dos tecidos (Funk; Musa, 2020; Cano-Martínez; Rubio-Ruíz; Guarner-Lans, 2024).

Na homeostase, esse processo está em equilíbrio com a morte celular programada, por meio do controle da produção de fatores promotores e inibidores do crescimento (Al-Bedeary, Getta, Al-Sharaf, 2020). Porém, um desbalanço entre esses fatores em decorrência de mutações genéticas e/ou epigenéticas incidentes em células saudáveis, resulta em um crescimento anormal conhecido como tumor, ou neoplasia, que pode ser classificado como benigno ou maligno (Patel, 2020).

Os tumores benignos são definidos por crescimento lento de células diferenciadas, ou seja, morfologicamente semelhantes às do tecido de origem, restritas em sua localização primária e sem capacidade de invadir tecidos adjacentes ou distantes. A massa tumoral formada possui bordas bem definidas, com capacidade de comprimir órgãos e vasos sanguíneos (Abdullah *et al.*, 2022; Boutry *et al.*, 2022). Tipos específicos de tumores benignos podem evoluir para malignidade, incluindo os pólipos do cólon, que podem se transformar em câncer colorretal (Patel, 2020).

Todavia, os tumores malignos, conhecidos como câncer, são constituídos fenotipicamente por células indiferenciadas. Essas células exibem características autonômicas e se proliferam descontroladamente, criando uma massa tumoral com bordas irregulares. Somado a isso, podem se disseminar do local de origem para outras partes do corpo através da corrente sanguínea ou dos vasos linfáticos, um processo chamado de metástase (Ahmad; Ahsan, 2020).

As neoplasias malignas são consideradas um problema de saúde pública e socioeconômica mundial, visto que são a segunda causa de morte por doença

no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares, e a principal desordem entre mortes prematuras em mais de 130 países (Chanu; Singh, 2024; Jackman *et al.*, 2024).

Segundo os indicadores mais recentes da base de dados do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) da *International Agency for Research of Cancer* (IARC), apenas no ano de 2022 foram registrados mais de 20 milhões de novos casos de câncer no mundo, com taxa de 9,7 milhões de mortes. Excluindo o câncer de pele não melanoma, os tipos mais incidentes foram o câncer de pulmão (12,4%), seguido pelo de câncer de mama feminino (11,6%) e colorretal (9,6%). O câncer de pulmão (18,7%) foi o mais letal neste ano, seguido pelo colorretal (9,3%), fígado (7,8%) e de mama feminina (6,9%) (Bray *et al.*, 2024). Além disso, foi estimado que, até 2040, cerca de 29,5 milhões de novos casos da doença sejam registrados globalmente (Khiari *et al.*, 2024).

No Brasil, a última estimativa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelou que, para o triênio 2023-2025, são esperadas mais de 704 mil novas ocorrências, com destaque para o câncer de pele não melanoma (220 mil) como o mais incidente, seguido pelo câncer de mama feminino (73 mil), de próstata (71 mil) e o colorretal (45 mil) (Oliveira *et al.*, 2023).

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças, com características biológicas e clínicas variantes (Fearon, 1999; Shaji *et al.*, 2024). Essas neoplasias podem ser classificadas histologicamente em quatro tipos principais: carcinomas, sarcomas, leucemias ou linfomas (Sucharitha, 2023).

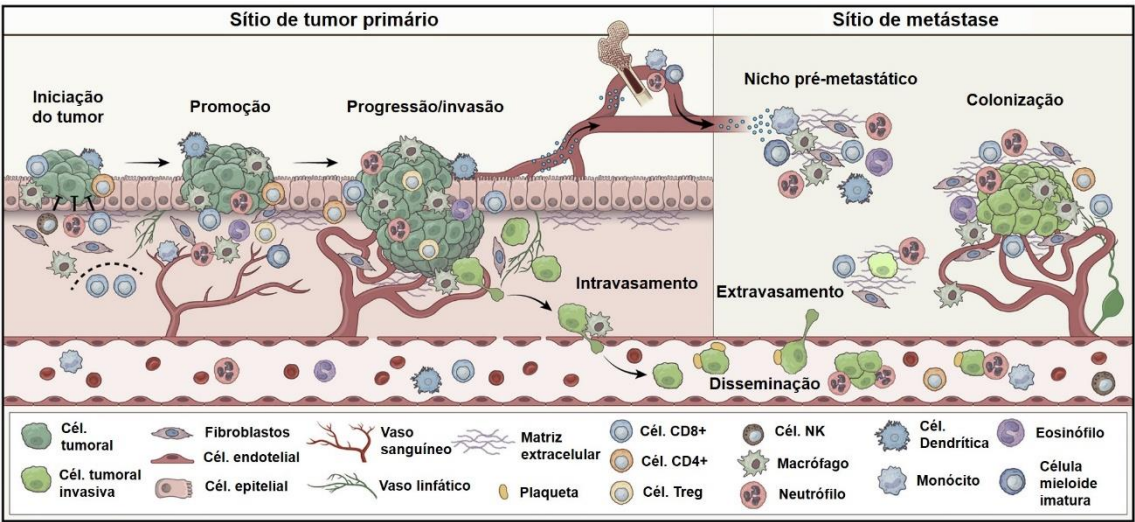
Os carcinomas constituem cerca de 90% de todos os cânceres humanos, surgindo em tecidos epiteliais que revestem órgãos, e em glândulas como o subtipo adenocarcinoma (Del Pino Herrera; Ferrall-Fairbanks, 2024). Os sarcomas são tumores malignos em tecidos moles e ósseos, que afetam tecidos conjuntivos, como ossos, músculos, tecidos fibrosos e cartilagens (Vodanovich; Choong, 2018). Já as leucemias, são tipos de câncer que envolvem os tecidos responsáveis pela formação do sangue como a medula óssea, enquanto que os linfomas se originam no tecido linfático. Juntos, esses dois tipos correspondem a 8% das malignidades humanas (Ahmad; Ahsan, 2020).

No que se refere à etiologia, o desenvolvimento do câncer está condicionado a fatores endógenos e exógenos. As causas endógenas envolvem mutações hereditárias e aquelas que ocorrem de forma espontânea (Li, 2021;

Shaposhnikov; Nepomnyaschaya; Yurieva, 2022). Entre os exógenos, responsáveis pela origem de 90-95% dos tumores malignos (Klaunig, 2019), são exemplos as exposições ambientais e ocupacionais a agentes químicos, físicos e biológicos conhecidos como agentes carcinogênicos, como o álcool, tabaco, poluentes, infecções virais e bacterianas, e radiação (Hill, 2019; Williams, 2019; Jessurun, 2021), além de fatores ligados ao estilo de vida, como obesidade e sedentarismo (Friedenreich; Ryder-Burbidge, McNeil, 2020).

A nível celular, o desenvolvimento da patogenicidade maligna, conhecido como carcinogênese (**Figura 1**), é constituído por três etapas: iniciação, promoção e progressão (Nachef; Bourguignon; Foray, 2024).

Figura 1. Etapas da carcinogênese e microambiente tumoral



Legenda: A carcinogênese é segmentada em três estágios: iniciação, promoção e progressão. A evolução desse processo ocorre em detrimento da instalação de um microambiente tumoral, constituído não só por células mutadas, mas também por células do sistema imunológico, fibroblastos associados ao câncer, células endoteliais e a matriz extracelular, que influenciam diretamente no crescimento do tumor. As células cancerígenas escapam das funções supressoras do sistema imune, progredindo a tumorigênese ao se disseminarem, via corrente sanguínea e/ou linfática, para outros tecidos com auxílio das células desse microambiente, processo conhecido como metástase.

Fonte: Adaptado de De Visser; Joyce, 2023.

Na etapa de iniciação, uma célula saudável é exposta a agentes carcinogênicos que são substâncias capazes de causar genotoxicidade, ou seja, danos no DNA, ou pode sofrer esses danos espontaneamente, produzindo acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas, que dá origem a uma

população de células modificadas irreversivelmente de forma lenta e gradual (Fishbein *et al.*, 2021; Ravi *et al.*, 2022).

Esses eventos resultam em mutações ou superexpressão de proto-oncogenes, que são genes de funcionamento normal que podem sofrer alterações se tornando um oncogene promotor de tumor, como é o exemplo dos genes codificadores das proteínas *Myc* (fator de transcrição *Myc*), *RAS* (proteína Rat sarcoma vírus), *FOS* (proteína Fos), *JUN* (proteína Jun) e *ERK* (proteína cinase regulada por sinal extracelular), os quais possuem potencialidade em induzir o câncer ao promover proliferação e sobrevivência celular. Além disso, ocorre a inativação de genes supressores de tumor, como o que codifica a fosfoproteína p53, cuja função normal é de proteger a célula contra danos genéticos inibindo proliferação e induzindo a morte celular programada, a apoptose (Kontomanolis *et al.*, 2020; Langevin; Kelsey, 2020).

Na etapa de promoção acontece a expansão clonal das células iniciadas e amplificação das mutações, gerando lesões pré-neoplásicas (Compton, 2020). No estágio concluinte da carcinogênese, a progressão, são acometidas lesões malignas irreversíveis independentes de estímulos internos ou externos, conduzindo a crescimento tumoral acelerado, instabilidade genética, invasão para outros tecidos, e, principalmente, a angiogênese, como uma característica fundamental para o progresso e manutenção da malignidade (Oliveira *et al.*, 2007; Lopez; Bleich, 2020).

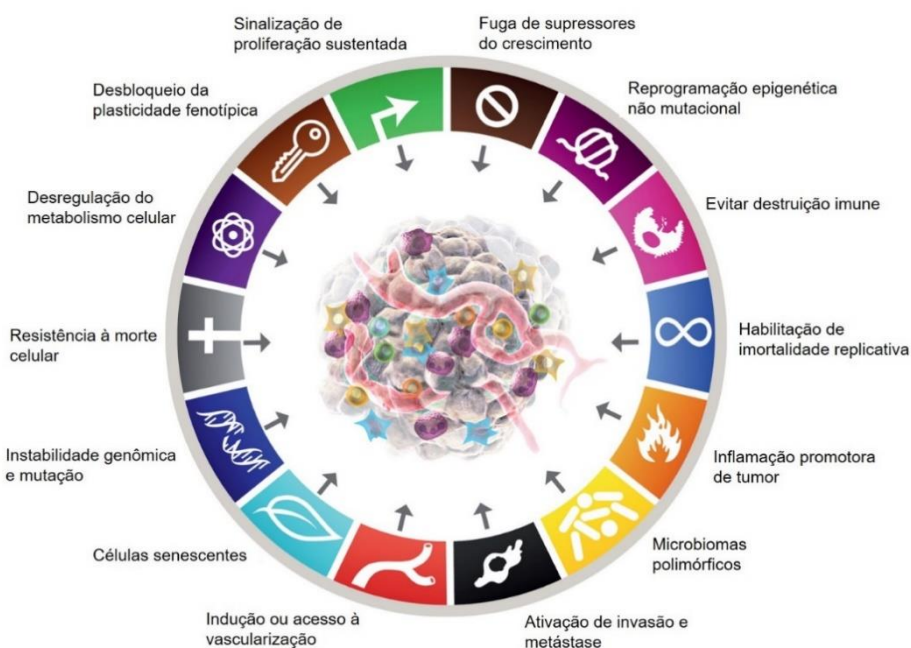
Esse processo ocorre em meio ao microambiente tumoral, que é constituído também por células do sistema imunológico, fibroblastos associados ao câncer, células endoteliais e a matriz extracelular, que modulam a proliferação celular, favorecem a evasão ao sistema imune pelas células cancerígenas, estimula a angiogênese e contribui para a invasão a outros tecidos e a metástase (De Visser; Joice, 2023).

Apesar da heterogeneidade tumoral, evidenciada pela diversidade genética e molecular dessas células, elas ainda compartilham comportamentos semelhantes associadas ao fenótipo maligno (Hass; Von Der Ohe; Ungefroren, 2020). No início do século, os pesquisadores Hanahan e Weinberg definiram as marcas biológicas do câncer (do inglês: *Hallmarks of cancer*), que são as principais propriedades funcionais alteradas ou adquiridas por essa população

de células, com informações atualizadas ao longo das décadas (Hanahan; Weinberg, 2011).

As células cancerígenas desenvolvem catorze capacidades funcionais essenciais para o desenvolvimento e manutenção da massa tumoral (**Figura 2**), incluindo: (1) sinalização sustentada da proliferação; (2) fuga de supressores do crescimento; (3) reprogramação epigenética não mutacional; (4) evasão do sistema imunológico; (5) habilitação da imortalidade replicativa; (6) inflamação promotora de tumor; (7) microbiomas polimórficos; (8) ativação de invasão e metástase; (9) indução ou acesso à vascularização; (10) células senescentes; (11) instabilidade genômica e mutação; (12) desregulação do metabolismo celular; (13) desbloqueio da plasticidade fenotípica, e por fim (14) resistência à morte celular, principalmente à apoptose (Hanahan, 2022).

Figura 2. Marcas biológicas (“hallmarks”) do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.

2.2 Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular programada fisiológica, rigorosamente regulada para manter a homeostase dos organismos multicelulares, que ocorre quando há equilíbrio entre a proliferação e morte

celular, desempenhando papéis importantes no processo de saúde e doença (Das *et al.*, 2021).

Este tipo de morte é componente essencial para o desenvolvimento embrionário, fetal e de tecidos adultos, na cicatrização de feridas e na remoção de células danificadas ou disfuncionais, impedindo, por exemplo, a formação de um tumor (Vitale *et al.*, 2023). Alterações nas vias normais da apoptose podem ocasionar doenças neurodegenerativas, autoimunes, propagação de patógenos intracelulares, danos cardiovasculares e câncer (Singh; Letai; Sarosiek, 2019).

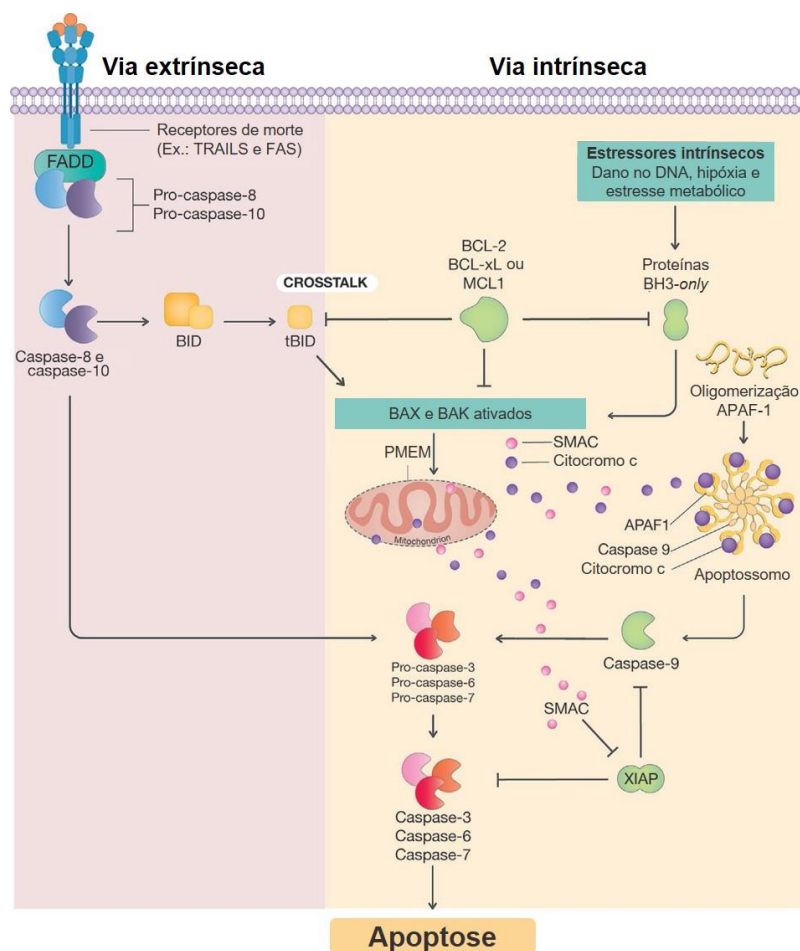
O processo apoptótico envolve eventos morfológicos e bioquímicos específicos, como condensação de cromatina (picnose), fragmentação do núcleo (cariorrexe), compactação do citoplasma, formação de “*blebs*” (bolhas) na membrana plasmática, e por fim a fragmentação em corpos apoptóticos que são fagocitados por células parenquimatosas ou macrófagos, etapa facilitada pela exposição da fosfatidilserina na superfície celular, prevenindo a necrose secundária e consequente inflamação (Westman; Grinstein; Marques, 2020; Das *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2023).

Essas características distinguem a apoptose da necrose, outro tipo de morte celular. Enquanto que a apoptose é um processo controlado e programado, a necrose ocorre de forma desordenada, causada por estímulos externos que levam à ruptura da célula e extravasando conteúdo intracelular, o que ativa a resposta inflamatória do tecido circundante (Park *et al.*, 2023).

As caspases são uma classe de enzimas proteases cisteínicas e aspartato específicas, que executam os eventos apoptóticos. Elas são encontradas na forma de pró-enzimas inativas, ativadas por autoclivagem ou proteólise em resíduos de aspartato por outras caspases. São divididas em caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10) e caspases executoras (3, 6 e 7) (Neophytou *et al.*, 2021).

Duas vias de sinalização principais que desencadeiam a apoptose são bem estudadas: (1) a via intrínseca, ou mitocondrial, que é normalmente ativada por sinais intracelulares; (2) via extrínseca, ou do receptor de morte, que é acionada por sinais extracelulares (Neophytou *et al.*, 2021) (**Figura 3**).

Figura 3. Via extrínseca e intrínseca da apoptose



Legenda: Na via extrínseca, uma molécula agonista extracelular ativa receptores de morte (Fas, TRAIL ou TNFR) que recruta proteína adaptadora (FADD) e as pró-caspases 8 e 10 que são clivadas e ativadas em caspases 8 e 10, que ativam as caspases executoras 3, 6 e 7 para induzir os eventos apoptóticos. Também clivam a proteína pró-apoptótica BID em tBID, que estimula a via intrínseca. A via intrínseca inicia a partir da ativação de proteínas pró-apoptóticas BH3-only que resulta na oligomerização de BAX e BAK. Com isso, são formados poros na mitocôndria que leva a permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM), liberando fatores apoptogênicos como citocromo c e SMAC. No citosol, o citocromo c se liga ao APAF-1, formando o apoptossomo com a pró-caspase 9, o que ativa a caspase 9. Esta, por sua vez, sofre autoproteólise e ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7, que induzem a apoptose. A proteína SMAC (ou DIABLO) é pró-apoptótica e inibe a XIAP, que normalmente bloqueia as caspases efetoras e a caspase 9.

Fonte: Adaptado de Balaji *et al.*, 2021.

A via intrínseca é ativada por estímulos internos como danos no DNA, hipóxia, estresse oxidativo crítico, radiação ultravioleta (UV) e ativação de fatores oncogênicos. A resposta a esses estímulos é regulada pela família de proteínas BCL-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*). Essa família é constituída por membros pró-apoptóticos chamados de proteínas BH3-only, como BIM, BID, BIK, BMF, NOXA

e BBC3 (também conhecido como PUMA) (Carneiro; El-Deiry, 2020; Yuan; Ofengeim, 2024).

A função desses membros é inibir diretamente outros integrantes da família BCL-2 que são anti-apoptóticos, como BCL-2, MCL-1, BCL-XL e BCL-W, e ativar diretamente as pró-apoptóticas BAX e BAK. Quando ativadas, essas proteínas se oligomerizam e formam poros na membrana externa da mitocôndria, levando à permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM) com consequente liberação do citocromo C e outros fatores apoptogênicos para o citoplasma (Voss; Strasser, 2020; Yuan; Ofengeim, 2024).

O citocromo C associa-se com fator 1 de ativação da protease da apoptose (APAF-1) e a caspase-9 formando o apoptossomo, o que leva a ativação da caspase-9 que ativa, clivando, as caspases efetoras 3, 6 e 7, que, por sua vez, ativam ou inibem proteoliticamente outras enzimas. As endonucleases, quando ativadas, levam a induzem a fragmentação de DNA, e as flipases, quando inibidas, leva a translocação e exposição para o meio externo de fosfatidilserina, além de outros eventos que culminam na formação dos corpos apoptóticos (Voss; Strasser, 2020).

A via extrínseca, ou do receptor de morte celular, é iniciada por ligantes endógenos que se associam aos receptores de morte pró-apoptóticos causando sua trimerização. Entre os receptores estão o FASR, também conhecido como CD95, os receptores do fator de necrose tumoral (TNF) como TNFR1 TNFR2, e os receptores do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) como TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5. Esse processo é acompanhado pelo recrutamento de proteínas adaptadoras do Domínio de Morte Associado a FAD (FADD) e as pró-caspases iniciadoras 8 e 10, que ao serem clivadas e ativadas, ativam diretamente as caspases 3, 6 e 7 (Voss; Strasser, 2020; Das *et al.*, 2021; Yuan; Ofengeim, 2024).

Paralelo a isso, a caspase 8 ativada pela via extrínseca pode também executar uma clivagem proteolítica da proteína pró-apoptótica BID, da família BH3-*only*, para a forma truncada tBID que inicia a via intrínseca ao ativar BAX e BAK, servindo como um elo entre as duas vias, amplificando o sinal apoptótico. A nível transcrricional, BID é regulado positivamente pelo p53 (Carneiro; El-Deiry, 2020).

No câncer, as células malignas desenvolvem resistência à apoptose, em grande parte devido à mutação ou inativação do supressor de tumor p53, responsável por induzir genes pró-apoptóticos da família BCL-2 e receptores de morte (Singh, LIM, 2022). No câncer colorretal há a deleção do gene p53, o que facilita a proliferação celular e progressão da doença (Liebl; Hofmann, 2021).

Na clínica oncológica são conhecidos inúmeros agentes quimioterápicos indutores de apoptose, como parte do mecanismo de ação citotóxico, incluindo o 5-FU, irinotecano, paclitaxel, cisplatina, doxorrubicina, entre outros (Chaudhry *et al.*, 2022).

2.3 Estresse oxidativo no câncer

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre aumento relativo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), em relação a agentes antioxidantes, causando danos oxidativos celulares como danos a proteínas, fosfolipídios e mutações pontuais em ácidos nucleicos (Arfin *et al.*, 2021).

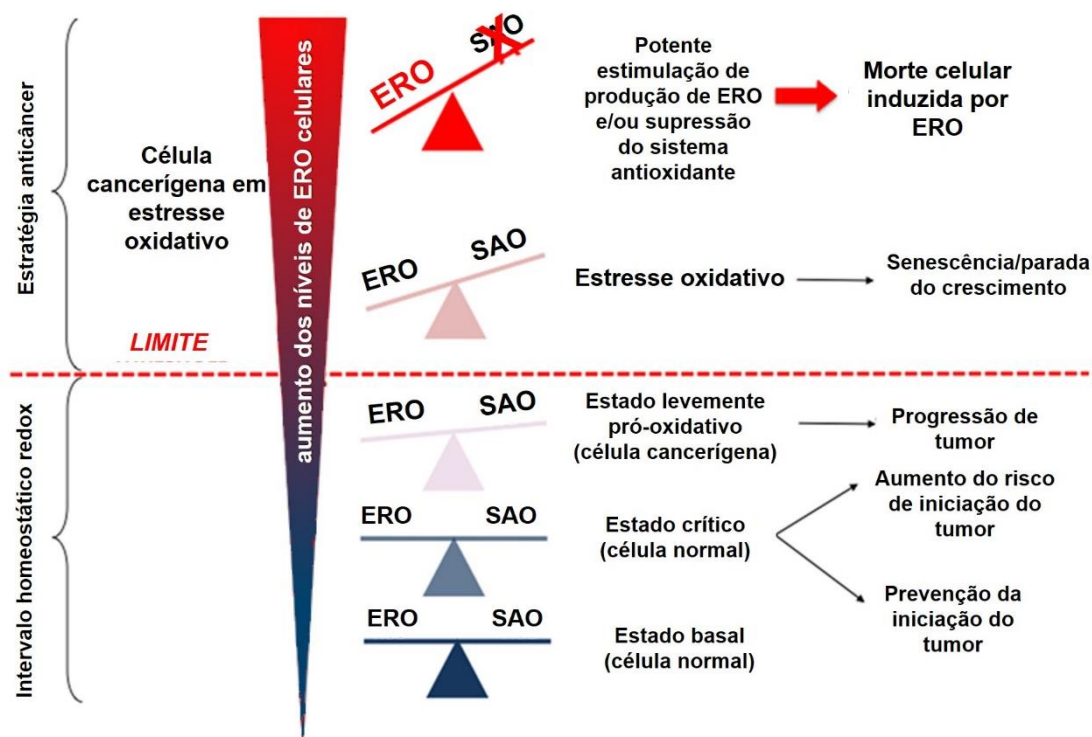
Existem duas formas de ERO: (1) os radicais, que são moléculas pequenas derivadas do oxigênio molecular com elétrons desemparelhados, como o ânion superóxido (O_2^-), radicais de hidroxila ($OH^\cdot$), peroxila ($RO_2^\cdot$), e os (2) não radicais, que são moléculas que não possuem elétrons livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl) (Jelic *et al.*, 2021; Sarmiento-Salinas *et al.*, 2021).

Essas espécies reativas são subprodutos do metabolismo celular, sendo necessárias para a homeostase e vias de sinalização. São produzidas pela cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, por enzimas NADPH oxidases (NOX) no retículo endoplasmático (RE) e membrana plasmática, peroxissomos, lisossomos, entre outros (Zhang *et al.*, 2022a). Fatores exógenos, como exposição a agentes carcinogênicos e outros relacionados ao desenvolvimento de câncer, também são indutores de produção de ERO (Sarmiento-Salinas *et al.*, 2021).

Em condições fisiológicas, os níveis intracelulares de ERO são relativamente baixos devido ao sistema antioxidante que impede o acúmulo exacerbado (**Figura 4**). Esse sistema é composto por: pequenas moléculas não

catalíticas que neutralizam essas espécies, como a melatonina, melanina, GSH, ácido úrico, polifenóis e vitaminas E e C. Outra forma de eliminação inclui antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e peroxirredoxinas (Hayes; Dinkova-Kostova, 2020; Jelic *et al.*, 2021).

Figura 4. Consequências dos diferentes níveis de espécies reativas de oxigênio



Legenda: O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode promover morte celular, senescência/parada do crescimento celular ou o câncer. O sistema antioxidante (SAO) previne o aumento de ERO e o risco de carcinogênese em células saudáveis, garantindo homeostase do estado redox. Porém, quando há um desbalanço entre ERO e SAO, com o aumento de radicais livres, estes podem contribuir para a iniciação do tumor em células sadias, como também o estado pró-oxidativo estimula a progressão de tumor, ainda se mantendo na homeostase redox devido ao SAO, que é estimulado em células cancerosas. Todavia, um maior aumento intracelular de ERO ultrapassa um certo limiar e a célula entra em estado de estresse oxidativo, onde para sobreviver, a célula para o ciclo celular (parada do crescimento) para reparar os danos e evitar a morte. Apesar disso, a quimioterapia citotóxica quando aplicada, aumenta ainda mais os níveis de ERO para causar lesões irreversíveis e levar a indução de morte celular, como a apoptose.

Fonte: Adaptado de Vučetić *et al.*, 2017.

Em níveis basais, ERO em células sadias contribui na manutenção do equilíbrio redox, participando de sinalizações celulares como segundos mensageiros em vias relacionadas com a proliferação, diferenciação e crescimento celular, além de defesa imunológica (Manoharan *et al.*, 2024).

Porém, quando há um aumento excessivo desses radicais, ultrapassando a capacidade defensiva do sistema antioxidante, pode ocasionar o estresse oxidativo que detém um papel dual: a abundância de ERO pode ser indutor de apoptose, ou contribuinte da carcinogênese, devido a oxidação no DNA que leva a mutações em oncogenes e genes supressores de tumores (Hayes; Dinkova-Kostova, 2020).

No papel de promotor de tumor, as altas concentrações de ERO em células cancerígenas já estabelecidas contribuem ativando vias de sinalização de sobrevivência e proliferação celular. Esse efeito ocorre devido a inativação de supressores de tumor como o homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) e o p53, além da ativação da via NF- κ B. Além disso, as ERO são associadas a invasão, angiogênese e metástase, pela ativação de oncogenes como proteína cinase B (PKB/AKT), ERK e c-MYC (Hayes; Dinkova-Kostova, 2020; Arfin *et al.*, 2021). Conjuntamente, ativam sistemas antioxidantes e desintoxicantes, que são meios desenvolvidos pela célula tumoral para equilibrar o estresse oxidativo aberrante, somado à estimulação de vias anti-apoptóticas (Sarmiento-Salinas *et al.*, 2021).

O estresse oxidativo desempenha um papel central no desenvolvimento do CCR, influenciando diretamente as etapas de iniciação e promoção da carcinogênese, além da formação da doença inflamatória intestinal (DII), considerada um fator de risco. Os radicais livres atuam promovendo danos ao DNA, e em macromoléculas como proteínas e lipídios nas células da mucosa intestinal. A peroxidação lipídica, por exemplo, compromete a integridade das membranas e funções das mitocôndrias, produzindo subprodutos tóxicos como malondialdeído, que forma complexos com o DNA que induz mutações em oncogenes e genes supressores de tumor (Jelic *et al.*, 2021; Bardelčíková; Šoltys; Mojžiš, 2023).

Por outro lado, vários agentes quimioterápicos, incluindo alguns para o tratamento de CCR, agem por produzir excessivamente radicais livres para eliminar os tumores por lesões irreversíveis. São exemplos, o 5-FU, cisplatina, doxorrubicina, paclitaxel, vincristina, vimblastina, entre outros (Aboelella *et al.*, 2021). Diante disso, a indução de oxidação por moléculas antitumorais é uma abordagem promissora no tratamento do câncer.

2.4 Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR), que atinge o cólon e o reto do intestino grosso, foi o terceiro tipo da doença mais diagnosticado no mundo em 2022, com aproximadamente 2 milhões de novos casos, e o segundo com a maior taxa de mortalidade, com quase 1 milhão de óbitos registrados, sendo mais frequente no sexo masculino. A América do Sul apresentou maior incidência, devido a razões socioeconômicas, mudanças comportamentais e alimentares (Bray *et al.*, 2024; Siegel; Giaquinto; Jemal, 2024).

Em escala global, foi observado que indivíduos da faixa etária de 50 a 74 anos detém o maior índice de diagnósticos. Também foi estimado que a carga global do CCR para o ano de 2040 seja de 3,2 milhões de novos casos e 1,6 milhões de mortes (Morgan *et al.*, 2023).

As desigualdades socioeconômicas, políticas e culturais são as principais causas de mortalidade. A maior acessibilidade ao diagnóstico e tratamento está em regiões mais desenvolvidas. No contexto brasileiro, entre 1990 e 2019, os homens foram os que apresentaram taxas mais altas de mortalidade, reflexo da procura tardia por serviços de saúde, enquanto que as mulheres apresentaram aumento no número de diagnósticos entre 2008 e 2019 (Dobiesz, 2022; Schaedler *et al.*, 2024).

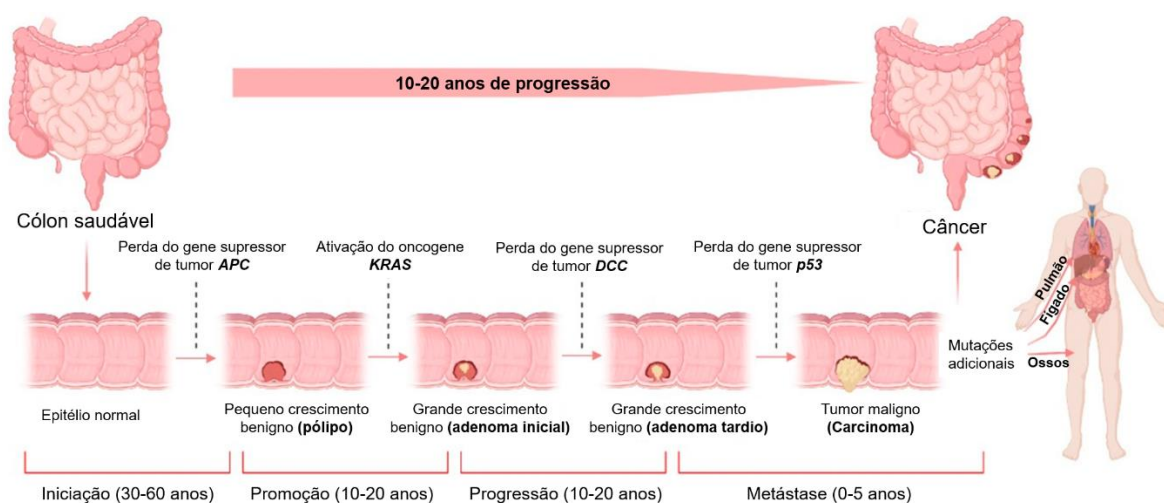
No Brasil, segundo os dados obtidos do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS) da plataforma DATASUS-TABNET do Ministério da Saúde, durante os meses de janeiro a outubro de 2024 foram registrados cerca de 67.083 mil óbitos por neoplasias, destes, 7.306 (10,89%) foram por CCR. Das mortes reportadas por este tipo de câncer, e apenas neste período analisado, 50,8% foram referentes ao sexo feminino e 49,2% ao sexo masculino, com uma mínima diferença; 5.375 (73,5%) foram de indivíduos entre 50 a 70 anos. As regiões Sudeste, Sul e Nordeste foram as mais frequentes, em ordem decrescente, seguidas pelo centro-oeste e norte (DATASUS, 2024).

O CCR é geneticamente heterogêneo, uma vez que, de todos os tumores malignos, é o que mais apresenta mutações somaclonais, ou seja, espontâneas (Hossain *et al.*, 2022). Esses tumores surgem a partir de neoplasias benignas, os pólipos colorretais, que são anormalidades de células epiteliais

hiperproliferativas formadas no cólon e/ou no reto do intestino grosso, mas que podem se tornar lesões pré-cancerígenas categorizadas como adenomas tubulares tradicionais, que corresponde a 90% dos casos, ou pólipos serrilhados, ambos originados em glândulas ou tecidos glandulares (Arends, 2013; Nguyen; Goel; Chung, 2020).

A sequência clássica e gradual adenoma-carcinoma ocorre quando há uma desregulação entre os mecanismos de reparo do DNA e da proliferação celular, devido ao acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas (Fearon; Vogelstein, 1990) (**Figura 5**). As células se tornam mais displásicas, adquirindo aspecto morfológico maligno potencialmente invasivo, o carcinoma, desenvolvido por meio de vias conhecidas como: instabilidade cromossômica (CIN), instabilidade de microssatélites (MSI) ou neoplasia serrilhada (Hawkins *et al.*, 2002; Currais; Rosa; Claro, 2022).

Figura 5. Progressão da carcinogênese do câncer colorretal



Legenda: A carcinogênese do câncer de cólon e reto (colorretal) é constituída pelo avanço de estágios que podem durar décadas. Na iniciação, ocorre mutação em gene supressor de crescimento APC que leva ao desenvolvimento de tumor benigno (pólipo), que cresce durante a promoção com a ativação do oncogene KRAS, originando lesões pré-cancerígenas, os adenomas. Após a perda de genes supressores de tumor DCC e p53, o carcinoma (tumor maligno) é originado. O processo de metástase do CCR ocorre principalmente para os ossos, pulmão e fígado.

Fonte: Adaptado de Hossain *et al.*, 2022.

A via CIN é responsável por 75% dessas neoplasias. Um dos primeiros eventos genéticos ocorridos, encontrado em 80% dos casos de CCR, é a mutação inativadora do gene *adenomatous polyposis coli* (APC), que codifica um

supressor de tumor que controla a via de sinalização Wnt, envolvida com proliferação e diferenciação celular. A APC normalmente controla os níveis de β -catenina que, se acumulada devido a ativação da via Wnt e/ou deleção de APC, leva ao aumento da proliferação celular resultando nos pólipos, devido a transcrição de genes como *Myc* e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Mann *et al.*, 1999; Arends, 2013; Randrian; Evrard; Tougeron, 2021).

As mutações ativadoras do oncogene KRAS (oncogene homólogo ao sarcoma de ratos de Kirsten), encontradas em 40-45% dos tumores, aumentam a codificação da proteína, de mesmo nome, envolvida na ativação constitutiva da sinalização MAPK/ERK (quinase ativada por mitógenos/quinase regulada por sinal extracelular) e do NF- κ B (fator de transcrição nuclear κ B), aumentando a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, um passo essencial para a progressão do adenoma. Além disso é componente de sinalização da via do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Ruffinelli *et al.*, 2021; Currais; Rosa; Claro, 2022).

Entre outras contribuições para a progressão, está a inibição do gene do receptor de netrina-1 (DCC), um supressor de tumor que ao ser inativado permite o crescimento do adenoma (Mehlen; Fearon, 2004; Nguyen; Goel; Chung, 2020). E como passo final para a transformação em adenocarcinoma, está a inibição do “guardião do genoma”, o gene codificador da proteína p53, que, ao perder sua função, deixa de reparar danos no DNA e de promover a apoptose e parada do ciclo celular como resposta (Nguyen; Goel; Chung, 2020; Liebl; Hofmann, 2021).

Em contraste com a via CIN que pode demorar mais de uma década para se desenvolver, a via carcinogênica MSI progride mais rapidamente, de 1 a 3 anos, e é observada em 15% dos casos do CCR (Currais; Rosa; Claro, 2022). Essa via é desencadeada por defeitos no sistema de reparo de incompatibilidades de DNA (MMR), acumulando erros em regiões de microsatélites, que são pequenas sequências repetitivas do DNA (Randrian; Evrard; Tougeron, 2021).

O terceiro mecanismo acontece por meio de pólipos serrilhados, definidos como lesões em forma de dentes de serra na mucosa do cólon, que dão origem ao adenocarcinoma por meio da via serrilhada (De Palma *et al.*, 2019). Essa rota é caracterizada por hipermetilação no DNA em locais regulatórios específicos, as ilhas de dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina (CpG), promovendo

instabilidade de microssatélite (MSI) (Eads *et al.*, 1999; Nguyen; Goel; Chung, 2020).

Também ocorre mutação no proto-oncogene B-Raf (BRAF) (mutação V600E), que ativa constitutivamente a proteína BRAF que participa da sinalização da via MAPK/ERK, estimulando proliferação descontrolada e evitando a apoptose (Davies *et al.*, 2002). Mutações em BRAF são correlacionadas a mau prognóstico, presente em 8% dos cânceres colorretais metastáticos (Venderbosch *et al.*, 2014; Taieb *et al.*, 2019).

Entre os fatores de risco, o desenvolvimento do tumor é condicionado a fatores modificáveis, relacionados ao estilo de vida, incluindo a obesidade, sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo e dietas inadequadas (baixa ingestão alimentar de cálcio, vitamina D, fibras, frutas, vegetais, e a ingestão de carnes vermelhas e processadas) (Puzzono *et al.*, 2021; Lewandowska *et al.*, 2022; Hua *et al.*, 2023).

Dentre os fatores não modificáveis está a idade. É observado que adultos com mais de 50 anos são mais propensos a desenvolver a neoplasia, enquanto que homens são mais susceptíveis do que as mulheres (Steele *et al.*, 2014; Choi; Kim, 2023), segundo dados epidemiológicos, que também mostraram que grupos de homens e mulheres negros, e os não hispânicos, tiveram maiores taxas de incidência e mortalidade entre as raças (Sawicki *et al.*, 2021; Petrick *et al.*, 2021).

Pessoas com doenças inflamatórias intestinais, como colite ulcerativa e doença de Crohn, apresentam alto risco para o tumor. Quanto a hereditariedade, a polipose adenomatosa familiar (FAP), com mutação no gene APC, e a síndrome de Lynch, também chamada de câncer colorretal hereditário sem polipose, predispõe a doença entre os membros familiares (Sawicki *et al.*, 2021).

Entre os principais sintomas iniciais estão o sangramento retal, dor abdominal, anemia por deficiência de ferro, perda de peso e alteração no hábito intestinal (Holtedahl *et al.*, 2021; Fritz *et al.*, 2023). O rastreamento e diagnóstico do CCR pode ser feito por meio de endoscopia (colonoscopia, sigmoidoscopia e retoscopia), exames de fezes (teste de sangue oculto nas fezes, imunológico fecal e DNA fecal), exames de imagem (tomografia, ressonância magnética e ultrassonografia endorretal), biópsia, entre outros (Sawicki *et al.*, 2021).

O estadiamento pós diagnóstico pelo sistema TNM é usado como preditor de prognóstico e orientação terapêutica. Ele é avaliado por meio de análise patológica, que mede profundidade do tumor (T), o comprometimento linfonodal (N) e a presença de metástase (M). A estratificação do câncer, de acordo com a oitava edição (2017) do Manual AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), subdivide-o em estágios I-IV e destaca a importância de registrar a completude da ressecção (R0, R1 ou R2) (Chen *et al.*, 2021; Mahmoud, 2022).

2.5 Tratamento do câncer colorretal

De modo geral, as principais modalidades terapêuticas do câncer incluem: quimioterapia, radioterapia, ressecção cirúrgica, terapia alvo e imunoterapia, com estratégias selecionadas ao paciente de acordo com o tipo da doença, localização e gravidade (Debela *et al.*, 2021). Para o CCR, a abordagem clínica é a mesma, podendo ser dividida em tratamentos locais, sistêmicos ou combinados (Krasteva; Georgieva, 2022).

Os tratamentos locais incluem a cirurgia, a primeira linha terapêutica para casos em estágio inicial e em avançados, quando combinado com quimioterapia ou radioterapia tanto antes (neoadjuvante) quanto após (adjuvante) o procedimento. Esse recurso envolve incisão da massa tumoral sólida, e, em casos avançados, a retirada dos linfonodos, devido ao risco de metástase. As terapias de ablação (por radiofrequência, micro-ondas ou etanol) e embolização são meios alternativos à cirurgia, sendo este último adotado em casos metastáticos no fígado (Krasteva; Georgieva, 2022; Shinji *et al.*, 2022).

A radioterapia também é considerada para tratar localmente casos avançados, como neoadjuvante, adjuvante à cirurgia ou de modo paliativo (Shinji *et al.*, 2022).

A terapia sistêmica, aquela que pode atingir todo corpo por meio do fluxo sanguíneo, é constituída pela terapia alvo, imunoterapia e principalmente a quimioterapia. A terapia alvo, ou direcionada, é composta por anticorpos monoclonais (AcM) ou pequenas moléculas projetadas para atacar alvos específicos, como proteínas. Os AcM mais conhecidos para tratar o CCR são os antiangiogênicos: cetuximabe, um inibidor do receptor EGFR, lançado em 2004 como o primeiro da classe, e o bevacizumabe, um inibidor de VEGF usado para

tratar pacientes metastáticos, visto que é associado a melhora significativa na sobrevida global (Xie; Chen; Fang, 2020; Naz *et al.*, 2024).

Entre outros medicamentos Anti VEGF/EGFR estão os AcM aflibercept, ramucirumabe, panitumumabe e a pequena molécula regorafenibe (Xie; Chen; Fang, 2020). Dentre as pequenas moléculas desenvolvidas com outros alvos, está o encorafenibe, um inibidor da proteína BRAF (Li *et al.*, 2024).

A imunoterapia é uma estratégia inovadora no tratamento do CCR, que usa medicamentos que inibem pontos de verificação imunológica para potencializar a capacidade do sistema imunológico em reconhecer e destruir as células cancerígenas. A tecnologia dos AcM também é usada nesta modalidade, como os inibidores das proteínas PD-1 (receptor de morte programada 1) e CTLA-4 (antígeno-4 relacionado ao linfócito T citotóxico) do checkpoint imunológico: pembrolizumabe e ipilimumabe, respectivamente (Krasteva; Georgieva, 2022; Li *et al.*, 2024).

Além disso, estão em desenvolvimento ou em fase clínica, vacinas que estimulam as células imunológicas T e B para atacar as células tumorais colorretais, como é exemplo a OncoVax, além de outras vacinas baseadas em DNA, mRNA (micro ácido ribonucleico), proteínas e células dendríticas (Rastin *et al.*, 2024).

A quimioterapia é utilizada, além de regimes adjuvantes ou neoadjuvantes à cirurgia, como primeira linha de tratamento e especialmente em pacientes que não podem ser submetidos à cirurgia, e em casos de recorrência ou metástase. É composta por abordagem com agente único como o 5-fluorouracil (5-FU), um fármaco sintético análogo da timina e inibidor da replicação do DNA, ou por meio de combinações do 5-FU com outros agentes quimioterápicos com mecanismos de ação diferentes, como oxaliplatina (OX), irinotecano (IRI) e capecitabina (CAP ou XEL), que podem ser combinados como: FOLFOX (5-FU+OX), FOXFIRI (5-FU+IRI), XELOX ou CAPOX (CAP+OX) e CAPIRI (CAP+OX) (Xie; Chen; Fang, 2020; Hossain *et al.*, 2022).

Embora os mecanismos de ação variem, assim como outros agentes quimioterápicos, estes agem induzindo citotoxicidade, ou seja, promovem a morte celular, frequentemente pela ativação de apoptose como resultado final. Porém, não atuam de forma seletiva às células cancerígenas, também afetando células saudáveis. A falta de seletividade produz toxicidade sistêmica, resultando

em efeitos adversos como mielossupressão, alopecia, náuseas, vômitos, entre outros. Entre outras limitações, estão a resistência às drogas, desenvolvida pelas células tumorais, e a falha terapêutica (Van Den Boogaard; Komninos; Vermeij, 2022; Zeien *et al.*, 2022).

Para superar essas adversidades, uma vez que a quimioterapia sistêmica continua sendo uma das formas de tratamento mais eficazes do CCR e no geral, é buscado ampliar o arsenal terapêutico a procura de alternativas menos tóxicas e eficazes (Van Den Boogaard; Komninos; Vermeij, 2022).

2.6 Produtos naturais e derivados sintéticos no tratamento do câncer

Os produtos naturais são uma notória fonte de novos fármacos para o tratamento de inúmeras enfermidades, provenientes de fontes como microrganismos, animais, minerais e, principalmente, plantas medicinais, que são produtoras de metabólitos secundários classificados como alcaloides, taxanos, flavonoides, taninos, saponinas, quinonas, lignanas e terpenoides, responsáveis pelas atividades farmacológicas encontradas (Ali Abdalla *et al.*, 2022).

Os metabólitos secundários são moléculas fitoquímicas com função protetora para a planta, mas que desempenham efeitos terapêuticos no corpo humano e por isso são amplamente explorados pela indústria cosmética, alimentícia e farmacêutica (Twaij; Hasan, 2022).

No câncer há um importante destaque para a classe dos produtos naturais visto que, das 206 moléculas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da doença, entre as décadas de 1940 e 2020, 75% correspondem a produtos naturais ou seus derivados sintéticos bioativos (Newman; Cragg, 2020).

Dentre os fármacos de maior destaque obtidos a partir de produtos naturais ou de seus derivados, encontram-se a camptotecina, isolada da planta *Camptotheca acuminata*, que originou os derivados semissintéticos irinotecano e topotecano; o paclitaxel, extraído das cascas de *Taxus brevifolia*; a vincristina e vimblastina, derivadas da planta *Catharanthus roseus*; o etoposídeo e o teniposídeo como derivados semissintéticos da podofilotoxina, encontrada nas raízes de *Podophyllum peltatum* e *Podophyllum hexandrum*; e a doxorrubicina,

extraída da bactéria *Streptomyces peucetius*, evidenciando a obtenção por micro-organismos (Newman; Cragg, 2020; Ali Abdalla *et al.*, 2022).

O irinotecano é utilizado na clínica oncológica como primeira linha no tratamento do CCR, ao ser combinado com o 5-FU. Ele inibe a topoisomerase I impedindo a replicação de DNA e síntese de RNA. O SN-38, o metabólito ativo do irinotecano, vem sendo investigado em ensaios clínicos em humanos com CCR, principalmente o seu emprego em nanotecnologias, devido a sua potência antiproliferativa e efeito antiangiogênico, por meio da inibição do VEGF (Huang *et al.*, 2019; Liu, 2024).

Outras moléculas de produtos naturais ou derivados sintéticos estão em estudos de fase clínica em humanos (I-IV) para o tratamento do CCR. São exemplos o resveratrol e curcumina (fase I), ambos polifenóis; o polissacarídeo fúngico PSK (fase III); o derivado sintético macrolídeo do sirolimo (*Streptomyces hygroscopicus*), o everolimo (fase II); o Andrographolide (*Andrographis paniculata*) (fase II), berberina (*Berberis vulgaris*) (fase II/III) e silimarina (*Silybum marianum*) (fase IV), provenientes de plantas medicinais, entre outros. Estes têm como mecanismo de ação a indução de apoptose, efeito antiproliferativo, antiangiogênese e/ou parada no ciclo celular (Islam *et al.*, 2022).

Uma das principais vantagens do uso das moléculas dessa classe na terapêutica do câncer, é a capacidade de superar a resistência tumoral. Essas substâncias podem potencializar o efeito de agentes quimioterápicos, facilitando sua entrada nas células e, ainda, induzir outros mecanismos de ação simultâneos, como remodelação do microambiente tumoral ativando o sistema imunológico contra as células neoplásicas (Talib *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022b).

Uma abordagem alternativa no emprego dessas substâncias, são os conjugados anticorpos monoclonais com o fármaco citotóxico. Destacam-se o brentuximab vedotin (2011) para o tratamento de linfomas, composto por anticorpo anti-CD30 ligado ao semissintético MMAE (Monometil Auristatina E) da dolastatina 10, que por sua vez é um metabólito de molusco marinho (*Dolabella auricularia*); e o Sacituzumabe govitecan-hziy (IMMU-132) (2020) para o tratamento do câncer de mama, que consiste em um anticorpo anti-Trop-2 conjugado ao SN-38, o metabólito do irinotecano derivado da camptotecina (Huang; Lu; Ding, 2021).

Nesse sentido, é possível observar que os produtos naturais, além de atuarem como fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos e emprego em novas tecnologias, também podem servir de base para a criação de moléculas semissintéticas ou como inspiração para as sintéticas, expandindo sua relevância.

2.7 *Annona vepretorum* e o seu potencial farmacológico

A medicina tradicional explora há séculos o benefício farmacológico empírico de plantas medicinais e outros recursos naturais, para tratar as desordens de saúde. Esses conhecimentos etnofarmacológicos são repassados por gerações dentro das comunidades e catalogados na literatura científica, servindo, até os dias atuais, de arcabouço para a descoberta de novos medicamentos pela indústria farmacêutica (Marrelli, 2021).

O Brasil apresenta-se como uma região promissora no desenvolvimento de fármacos, devido a sua biodiversidade composta por mais de 8,5 milhões de espécies de plantas, algas, fungos e animais (Calixto, 2019). No país, já foram descobertos medicamentos importantes para o mercado farmacêutico como o captopril, mas, apesar da base científica solidificada, esse e outros não foram desenvolvidos e produzidos em território nacional (Braga, 2021).

Neste contexto, destaca-se a família Annonaceae, cujos 120 gêneros possuem mais de 2.400 espécies de árvores, arbustos e lianas, distribuídas pelas florestas tropicais pelo globo (Chatrou *et al.*, 2012; Teles *et al.*, 2015). No Brasil, são encontrados 29 desses gêneros, com destaque para *Annona* L., constituída por mais de 170 espécies das quais 25 são nativas, distribuídas pelos biomas: Caatinga, Cerrado, Amazônia, Mata Atlântica e Pantanal (Costa *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2014).

Diversas espécies do gênero *Annona* L. têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de doenças infecciosas, condições inflamatórias, diabetes e também para o câncer, no qual em algumas culturas são usadas as folhas e sementes devido às suas supostas atividades antitumorais (Abdul Wahab *et al.*, 2018; Al Kazman; Harnett; Hanrahan, 2022). As plantas do gênero são ricas em metabólitos secundários como terpenoides,

alcaloides, acetogeninas, flavonoides e compostos fenólicos (Menezes et al., 2021; Al Kazman; Harnett; Hanrahan, 2022).

A espécie *Annona vepretorum* Mart., conhecida popularmente como “pinha da Caatinga”, “araticum-da-Caatinga”, “bruteira” (Araújo et al., 2017) é endêmica do bioma Caatinga no nordeste brasileiro, apreciada pelos seus frutos que são consumidos como fonte nutricional ou para fins terapêuticos, como o tratamento de picadas de abelhas e de cobras, alergias, infecções microbianas e inflamações (Araújo et al., 2015) (**Figura 6**).

Figura 6. Planta e o fruto da espécie *Annona vepretorum* Mart.



Fonte: Siqueira Filho, 2020.

Investigações anteriores mostraram que derivados vegetais dessa espécie, como extratos e óleos essenciais, exibem atividades farmacológicas, incluindo antimicrobiana (Costa et al., 2012), antioxidante (Almeida et al., 2014), anti-inflamatória, antinociceptiva (Silva et al., 2015), anticonvulsivante, sedativa, ansiolítica, antidepressiva (Diniz et al., 2019), tripanocida, antimalárica (Meira et al., 2015) e citotóxica (Bonfim et al., 2016).

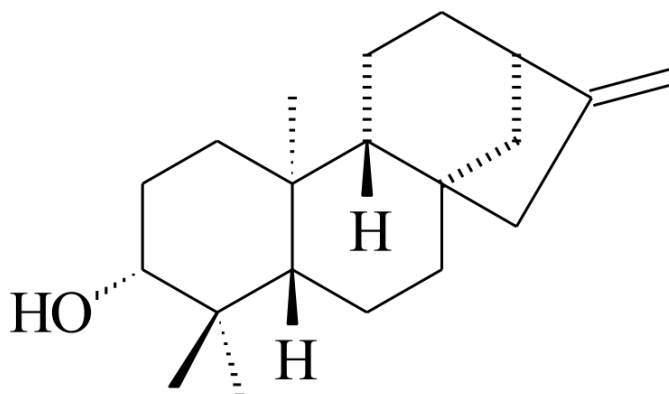
Muitas dessas propriedades têm sido associadas aos metabólitos secundários que são substâncias orgânicas bioativas. A constituição fitoquímica das plantas varia de acordo com a região de coleta e o tipo de derivado vegetal (Twaij; Hasan, 2022). De modo geral, entre os compostos bioativos presentes da espécie incluem alcaloides, terpenos, flavonoides, esteroides e compostos fenólicos (Silva et al., 2017).

Os óleos essenciais são ricos em metabólitos secundários como biciclogermacreno e o espatulenol (Bomfim *et al.*, 2016), assim como também de sesquiterpenos, a exemplo do β -felandreno e limoneno (Meira *et al.*, 2015). Um estudo em modelo *in vitro* mostrou que o óleo essencial das folhas da planta induziu citotoxicidade em linhagem de células de melanoma murino (B16-F10), carcinoma hepatocelular humano (HepG2), leucemia mieloide crônica humana (K562) e leucemia promielocítica humana (HL-60) (Bonfim *et al.*, 2016).

Os extratos das folhas de *Annona vepretorum* contém esteróides como β -sitosterol e estigmasterol além de flavonoides, como a rutina e a quercetina-3-O- β -L-rhamnose (Araújo *et al.*, 2017). Estudos *in vitro* com o extrato metanólico e clorofórmico das folhas exibiram elevada citotoxicidade frente às células de câncer de cólon humano (HCT 116) e sarcoma de camundongos (Sarcoma-180), além de apresentarem baixa toxicidade aguda em camundongos (Silva *et al.*, 2017).

Por sua vez, o extrato éter de petróleo obtido das cascas do caule, utilizado neste estudo, é rico em diterpenos do tipo *ent*-caureno (**Quadro 1**), com destaque para o inédito na literatura *ent*-3 β -hidroxi-caur-16-en-19-al (125,7 mg) e o majoritário *ent*-3 β -hydroxy-caur-16-eno (585,8 mg) (**Figura 7**), que apresentam efeito citotóxico frente a linhagens celulares de leucemia mielocítica crônica humana (K562), leucemia promielocítica humana (HL-60), carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e melanoma de camundongo (B16-F10) (Dutra *et al.*, 2014a; Dutra *et al.*, 2014b).

Figura 7. Estrutura química do diterpeno *ent*-3 β -hidroxi-caur-16-eno



Fonte: Dutra *et al.*, 2014b.

Quadro 1. Composição fitoquímica das cascas do caule de *Annona vepretorum*

Derivado vegetal	Parte da planta	Substância	Referência	
Extrato éter de petróleo		Ent-3β-hidroxi-caur-16-eno	Dutra <i>et al.</i> , 2014a	
		Ent-3β-hidroxi-caur-16-en-19-al		
		Ent-3β-acetoxi-caur-16-eno		
		Ent-3β-hidroxi-caurenóico ácido		
		Ácido caurenóico		
		Óxido de caryofileno		
		Humuleno epóxido II		
		β-Sitosterol		
		Estigmasterol		
		Campesterol		
Extrato metanólico	Cascas do caule	Ent-3β,4β-dihidroxi-18-nor-caur-16-eno	Araújo <i>et al.</i> , 2023	
		Dihidro-feruilotiramina		
		4-hidroxi-N-[2-(4-hidroxifenil)etil]-3,5-dimetoxi-benzenopropanamida		
		3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-N-[2-(4-hidroxifenil)etil]-2-propenamida (N-feruilotiramina)		
		Ent-3β -hidroxi-caur-16-eno		
		Espatulanol		
		β –Sitosterol		
		Ácido kaurênico		
		Ácido cauran-17-oico		
		Ent-3β,19-diidroxi-caur-16-eno		
		β -Sitosterol-3-O- β -D-glucosídeo		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os diterpenos *ent*-kauranos são compostos tetracíclicos frequentemente isolados de plantas da família Annonaceae. Destacam-se por possuir efeito citotóxico e antitumoral como o ácido caurenóico (Costa *et al.*, 2020), ação também observada no óxido de cariofileno (Fidyt *et al.*, 2016), estigmasterol (Bakrim *et al.*, 2022), campesterol (Zhu *et al.*, 2016) e no β -sitosterol (Bao *et al.*, 2022).

Uma investigação posterior caracterizou fitoquimicamente um extrato metanólico do caule dessa espécie. A análise resultou no isolamento de compostos específicos, incluindo o diterpeno *ent*-kaurano, inédito na literatura, *ent*-3 β ,4 β -dihydroxy-18-nor-kaur-16-ene, entre outras substâncias já conhecidas (**Quadro 1**) (Araújo *et al.*, 2023). Contudo, apesar dos estudos de citotoxicidade indicarem forte atividade dos derivados vegetais da espécie frente a células cancerígenas, os mesmos não se propuseram a investigar os mecanismos de atividade antitumoral.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* do extrato éter de petróleo obtido das cascas do caule de *Annona vepretorum* Mart. (EEP-Av).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do EEP-Av em diferentes linhagens de células tumorais humanas (HCT 116, HT-29, LoVo, MCF-7 e SK-MEL-28);
- Avaliar a citotoxicidade do EEP-Av em linhagem humana não tumoral derivada de queratinócitos de indivíduo sadio (HaCaT);
- Avaliar o perfil citotóxico do EEP-Av em diferentes tempos de tratamento na linhagem mais sensível;
- Determinar o índice de seletividade (IS) do EEP-Av e comparar com o controle positivo doxorrubicina;
- Avaliar o efeito antiproliferativo do EEP-Av;
- Investigar o tipo de morte celular induzido por EEP-Av;
- Investigar o efeito do EEP-Av sobre o estado redox celular;
- Sugerir um mecanismo envolvido no efeito citotóxico do EEP-Av.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A obtenção do extrato éter de petróleo das cascas do caule de *Annona vepretorum* Mart. (EEP-Av) foi realizada pelo Laboratório de Pesquisa em Química Orgânica de Sergipe (LABORGANICS), do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS) Campus de São Cristóvão, em colaboração do Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa e a Dra. Livia Macedo Dutra. O extrato foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Josean Fechine Tavares do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

O cultivo celular e os estudos *in vitro* de atividade antitumoral foram realizados nas dependências dos laboratórios de Oncofarmacologia (OncoFar/UFPB) e de Biofotônica (CBiotec/UFPB).

4.2 Material botânico

As cascas do caule de *Annona vepretorum* Mart. foram coletadas no dia 24 de maio de 2012, na Serra da Guia, no município de Poço Redondo, Sergipe, Brasil sob coordenadas geográficas 09°57'54" S, 37°51'46" W. A planta foi devidamente identificada pela Profa. Dra. Ana Paula do Nascimento Prata, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (DBI/UFS). Uma exsicata desta amostra foi depositada no herbário da Universidade Federal de Sergipe (Herbário ASE/UFS), com número de registro 23492 (número de registro SISGEN ACAA36).

4.3 Preparo das amostras

Antes da execução de cada ensaio experimental, o EEP-Av pesado (2 mg) foi diluído em 100 µL de DMSO (100%) para a obtenção de uma solução estoque (20.000 µg/mL). A partir dessa solução estoque, foram preparadas as diluições com diferentes concentrações do EEP-Av, para o tratamento nas células, utilizadas imediatamente após o preparo. A concentração de DMSO por poço não excedeu a concentração de 0,5%. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20°C e protegidas da luz.

4.4 Substâncias e reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (SigmaAldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), solução estabilizada de penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), tripsina 0,25% com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (GIBCO[®], Grand Island, New York, EUA), solução fosfato tamponada (PBS) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), soro fetal bovino (SBF) (GIBCO[®], Grand Island, New York, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica[®], Indaiatuba, São Paulo, Brasil), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Êxodo Científica[®], Sumaré, São Paulo, Brasil), azul de tripan (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), doxorubicina (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), N-acetilcisteína (NAC) (GIBCO[®], Grand Island, New York, EUA), iodeto de propídeo (Thermo Fisher[®], Rochester, New York, EUA), cloreto de sódio (NaCl) (GIBCO[®], Grand Island, New York, EUA), Cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), Hoechst 34580 (Invitrogen[®], Waltham, Massachusetts, EUA), cloreto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, EUA), metanol, violeta de genciana (Uniphar[®], João Pessoa, Brasil), cloreto de potássio (KCl) (GIBCO[®], Grand Island, New York, EUA), cloreto de cálcio (CaCl₂) (GIBCO[®], Grand Island, New York, EUA), sulfato de magnésio (MgSO₄) (GIBCO[®], Grand Island, New York, EUA), sulfato de sódio (Na₂SO₄) (GIBCO[®], Grand Island, New York, EUA).

4.5 Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: microscópio invertido Nikon eclipse TS100 (Olympus[®], Tóquio, Japão), cabine de fluxo de ar laminar vertical

Aeolus V (Telstar[®], São Paulo, Brasil), leitor de multidetecção Synergy HT (BioTek[®], Vermont, EUA), centrífuga Rotina 380R (Hettich[®], North Rhine-Westphalia, Alemanha), balança analítica eletrônica SHI-AUW220D (Shimadzu[®], São Paulo, Brasil), banho-maria AQUAline (LAUDA[®], São Paulo, Brasil), agitador magnético com aquecimento (Solab Científica[®], São Paulo, Brasil), incubadora de CO₂ MCO-18ACL-PA (Panasonic[®], Osaka, Japão), autoclave vertical linha CS-A (Primatec[®], São Paulo, Brasil), estufa de secagem (DeLeo[®] equipamentos laboratoriais, Rio Grande do Sul, Brasil), estereomicroscópio Televal 31 (Zeiss[®], BadenWürttemberg, Alemanha), câmera fotográfica OverShot A2500 (Canon[®], São Paulo, Brasil), microscópio confocal de varredura a laser (Leica[®], Hesse, Alemanha), microscópio Axio Observer A1 (Zeiss[®], Baden-Württemberg, Alemanha), geladeira DFN49 (Eletrolux[®], Paraná, Brasil), agitador MS 3 digital (IKA[®], Baden-Württemberg, Alemanha), e espectrofotômetro (Shimadzu, Japão).

4.6 Linhagens celulares e cultivo

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens celulares humanas: HCT 116 (adenocarcinoma colorretal), HT-29 (adenocarcinoma colorretal), LoVo (adenocarcinoma metastático colorretal), MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), SK-MEL-28 (melanoma) e HaCaT (queratinócitos adultos saudáveis), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (**Quadro 2**).

O cultivo celular foi realizado em frascos adequados com meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) ou meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, de acordo com a linhagem celular, suplementados com soro bovino fetal (SBF) 10% e antibiótico a 1% (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas incubadas em uma estufa biológica em condições de 37°C e 5% CO₂. A manutenção das garrafas de cultivo ocorreu a cada 48 ou 72 horas, com trocas de meio e procedimentos de repique, quando necessário, em um ambiente estéril no interior de uma cabine de fluxo laminar. A técnica de contagem de células em câmara de Neubauer utilizando o reagente azul de tripan, foi adotada para avaliar

a viabilidade celular antes de cada experimento, considerando-se uma viabilidade mínima de 90% (Gonçalves; Sobral, 2020).

Quadro 2. Linhagens de células tumorais e não tumoral utilizadas no estudo

Linhagens celulares	Tipo histológico	Origem	Meio de cultura
HCT 116	Adenocarcinoma colorretal	Humana	RPMI
HT-29	Adenocarcinoma colorretal	Humana	RPMI
SK-MEL-28	Melanoma	Humana	DMEM
MCF-7	Adenocarcinoma mamário	Humana	RPMI
LoVo	Adenocarcinoma colorretal metastático	Humana	DMEM
HaCaT	Queratinócitos (não tumoral)	Humana	DMEM

Legenda: HCT 116: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano; HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano; SK-MEL-28: linhagem celular de melanoma humano; MCF-7: linhagem celular de adenocarcinoma mamário; LoVo: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal metastático; HaCaT: linhagem celular de queratinócitos adultos saudáveis humanos; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; RPMI: Roswell Park Memorial Institute 1640.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Avaliação de citotoxicidade do EEP-Av em linhagens tumorais e não tumoral e determinação do Índice de Seletividade (IS)

A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Esse sal tetrazólio de cor original amarela permeia a membrana plasmática e, nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas, é convertido por enzimas desidrogenases em cristais de formazan insolúvel de coloração roxa, que podem ser quantificados espectrofotometricamente, obtendo-se a densidade óptica que é proporcional a quantidade de células viáveis (Ghasemi *et al.*, 2021).

Para a triagem, as células foram incubadas com apenas duas concentrações de EEP-Av (100 e 25 µg/mL) em placas de 96 poços por 72 horas, numa densidade de 5×10^5 células/mL para LoVo, 3×10^5 células/mL para HCT 116, HaCaT e HT-29, 2×10^5 células/mL para SK-MEL-28 e 1×10^5 células/mL para MCF-7, a 37°C com 5% de CO₂. Para as curvas concentração-resposta, as

células foram incubadas com diferentes concentrações do EEP-Av (3,12 – 200 µg/mL) ou doxorubicina (DXR) (0,078 – 10 µM) por 24, 48 ou 72 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação, o sobrenadante foi parcialmente retirado, seguido pela adição do MTT (5 mg/mL) e incubação por mais 4 horas. Em seguida, foi adicionado uma solução de SDS/HCL 0,01N para dissolver os cristais de formazan em agitação magnética *overnight*, e então as microplacas foram lidas em um espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA na absorvância de 570 nm (Gonçalves; Sobral, 2020). Para a triagem foi realizado apenas um experimento em quadruplicata, enquanto que para as curvas concentração-resposta, foram executados três experimentos independentes em triplicatas.

O índice de seletividade (IS) foi determinado a partir da razão entre a CI_{50} da célula não tumoral pela CI_{50} da célula tumoral, conforme a fórmula abaixo (Duarte *et al.*, 2022).

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ da linhagem não tumoral}}{CI_{50} \text{ da linhagem tumoral}}$$

4.8 Avaliação da capacidade de formação de colônias do EEP-Av

O ensaio de clonogenicidade, ou de formação de colônias, é uma técnica *in vitro* que mede a capacidade de uma única célula em sobreviver a longo prazo e formar colônia (>50 células) no seu redor, mesmo após tratamentos que possam causar danos em cromossomos, avaliando então a capacidade proliferativa (Adan; Kiraz; Baran, 2016; Bravo-San Pedro, *et al.*, 2021).

Para este ensaio, 1.000 células (HCT 116) por poço foram semeadas em placas 24 poços e, após 4 horas, foram tratadas com a CI_{50} (14 µg/mL) e metade (7 µg/mL) do EEP-Av por 48 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e mantidas com meio em cultura por aproximadamente 7 dias, em estufa em condições de 37°C com 5% de CO₂, ocorrendo manutenção com trocas de meio de cultivo em dias alternados. Finalizados os 7 dias, os poços foram lavados com PBS e as células foram fixadas com metanol 100%, e então coradas com solução de violeta de genciana (Bravo-San Pedro, *et al.*, 2021). As placas foram observadas em microscópio óptico e estereomicroscópio, onde os

poços foram fotografados e as colônias formadas, com no mínimo 50 células, foram contadas com auxílio do software Image J (NIH, EUA).

4.9 Investigação de mecanismos de ação antitumoral *in vitro* induzida por EEP-Av

4.9.1 Avaliação de morte celular por microscopia confocal com marcação de laranja de acridina e iodeto de propídio (LA/IP)

Para a investigação do tipo de morte celular, foi utilizado o ensaio de análise morfológica por microscopia confocal de varredura a laser, com marcação dupla pelos fluoróforos laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP). Esses corantes permitem a diferenciação entre os tipos de morte celular, apoptose e necrose. A LA é um corante metacromático vital que permeia as membranas celulares e cora ácidos nucleicos, tanto de células vivas quanto mortas, emitindo fluorescência verde (Gao *et al.*, 2020). Já o IP é impermeável às membranas, se intercalando ao DNA e emitindo fluorescência vermelha apenas em células que perderam a integridade de membrana (Ude *et al.*, 2022).

Neste experimento, as células HCT 116 (1×10^5 células/mL) foram incubadas em placas de 24 poços com a CI_{50} (14 $\mu\text{g/mL}$) e metade (7 $\mu\text{g/mL}$) do EEP-Av por 48 horas. A doxorrubicina (2,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Após o período de tratamento, as células foram centrifugadas (500 x g, 20°C, 5 minutos), ressuspensas em PBS e então marcadas com 10 μL de laranja de acridina (10 $\mu\text{g/mL}$) e iodeto de propídio (10 $\mu\text{g/mL}$). As células foram observadas sob microscópio confocal de varredura a laser, utilizando lasers de 488 e 552 nm, com emissão nas faixas de 510-541 nm e 639-701 nm (Gonçalves; Sobral, 2020). Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas, obtendo-se três imagens de campos aleatórios de cada replicata.

Os critérios para análise foram: as células viáveis foram evidenciadas pela coloração verde clara e estruturas intactas. Aquelas em estágio inicial da apoptose foram observadas com o núcleo verde brilhante e presença de condensação de cromatina, enquanto que o estágio tardio foi identificado por áreas alaranjadas/amareladas (verde/vermelho) de condensação de cromatina e formação de bolsas apoptóticas membranares (*blebs*). As células em necrose

tiveram seus núcleos corados apenas de vermelho (Renvoize *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2023).

4.9.2 Análise de alterações nucleares por coloração de Hoechst

O Hoechst 34580 é um corante fluorocromático azul permeável às membranas e de ligação específica ao DNA, bastante utilizado para observar características da apoptose, como condensação de cromatina e fragmentação de DNA (Swain *et al.*, 2020). A variação de intensidade de fluorescência é usada para observar alterações nucleares, pois quanto mais fluorescente, maiores os danos detectados (Fuchs *et al.*, 2023).

Neste experimento, as células HCT 116 (1×10^5 células/mL) foram incubadas em placas de 24 poços com a CI_{50} (14 $\mu\text{g/mL}$) e metade (7 $\mu\text{g/mL}$) do EEP-Av por 48 horas. A doxorubicina (2,5 μM) foi utilizada como controle positivo. Após o período de tratamento, as células foram centrifugadas (500 x g, 20°C, 5 minutos), ressuspensas em PBS e então marcadas com 20 μL de Hoechst (10 $\mu\text{g/mL}$) durante 20 minutos, sob proteção da luz e em temperatura ambiente. As células foram observadas em microscópio confocal de varredura a laser, utilizando o laser de 405 nm, com emissão na faixa de 410-600 nm. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas, obtendo-se três imagens de campos aleatórios de cada replicata. Foi utilizado o software Image J (NIH, EUA) para medir a intensidade de fluorescência (%).

4.9.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), com decorrente aumento de permeabilidade membranar, está criticamente envolvida com o início do processo apoptótico (Morse *et al.*, 2024). O corante catiônico lipofílico JC-1 (5,5',6,6'-tetraquilbenzimidazolilcarbocianina iodeto) é utilizado para avaliar o potencial de membrana mitocondrial. Em mitocôndrias saudáveis com alta polarização, o JC-1 se acumula e forma agregados que emitem fluorescência vermelha. Já em células em apoptose com mitocôndrias despolarizadas, com perda do $\Delta\Psi_m$, o JC-1 perde a capacidade de formar agregados e permanece em sua forma monomérica que emite fluorescência verde (Smiley *et al.*, 1991).

Neste experimento, as células HCT 116 (1×10^5 células/mL) foram incubadas em placas de 24 poços com a Cl_{50} (14 $\mu\text{g/mL}$) e metade (7 $\mu\text{g/mL}$) do EEP-Av por 48 horas. Após o período de tratamento, as células foram centrifugadas (500 x g, 20 °C, 5 minutos), ressuspensas em PBS e então marcadas com 20 μL de solução de JC-1 (2,5 μM) durante 20 minutos, com resguardo da luz e em temperatura ambiente. Para o grupo controle positivo, foi adicionado 10 μL de CCCP (cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona) (50 μM) por 5 minutos, seguido por 20 μL de JC-1 (2,5 μM) por 15 minutos. As células foram observadas sob microscópio confocal de varredura a laser. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas, obtendo-se três imagens de campos aleatórios de cada replicata. Para a análise dos dados foi utilizado o software Image J, e então a intensidade de fluorescência relativa (%) foi obtida.

4.9.4 Investigação do envolvimento de ERO no mecanismo do EEP-Av

Com o objetivo de investigar a participação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no efeito citotóxico de EEP-Av, as células de câncer colorretal (HCT 116) foram submetidas a um pré-tratamento com N-acetilcisteína (NAC). O NAC é um derivado do aminoácido L-cisteína com efeito antioxidante, que neutraliza ERO e previne o estresse oxidativo, além de ser um precursor da síntese da glutatona, outro antioxidante direto (Pedre *et al.*, 2021).

Nesse sentido, as células HCT 116 (3×10^5 células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços na presença ou ausência de NAC (10 μM) por 3 horas. Após esse período, as células foram tratadas com a Cl_{50} (14 $\mu\text{g/mL}$) e metade (7 $\mu\text{g/mL}$) do EEP-Av, e a Cl_{50} (48 h) de doxorubicina (4,0 μM), por 48 horas. Finalizado o tempo de tratamento, o sobrenadante foi parcialmente retirado, seguido pela adição do MTT (5 mg/mL) e incubação por mais 4 horas. Em seguida, foi adicionado uma solução de SDS/HCL 0,01N para dissolver os cristais de formazan em agitação magnética *overnight*, e então as microplacas foram lidas em um espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA na absorvância de 570 nm (Gonçalves; Sobral, 2020). Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

4.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism versão 8.0.2 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A comparação estatística entre os dados foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) *one way*, seguido pelo teste de Dunnet ou Tukey, conforme indicado, com nível de significância de $p < 0,05$.

A CI_{50} , concentração que inibe 50% da viabilidade celular, e seus intervalos de confiança de 95%, foram obtidos por regressão não linear utilizando-se a equação de Hill (GraphPad Prism, EUA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade do EEP-Av em linhagens de células humanas tumorais e não tumorais

O ensaio de MTT foi conduzido inicialmente como uma etapa de triagem, para investigar o possível efeito citotóxico do extrato éter de petróleo de *Annona vepretorum* (EEP-Av) sobre linhagens de células derivadas de variados tipos de cânceres humanos de importância clínica. Para tanto, foram utilizadas as linhagens celulares: adenocarcinoma colorretal (HCT 116), adenocarcinoma colorretal (HT-29), melanoma (SK-MEL-28), adenocarcinoma mamário (MCF-7) e adenocarcinoma colorretal metastático (LoVo), tratadas com 25 e 100 µg/mL do extrato por 72 horas (**Tabela 2**).

Tabela 1. Triagem de efeito citotóxico do EEP-Av frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas após 72 h de tratamento

Linhagens celulares	% de viabilidade celular	
	25 µg/mL	100 µg/mL
HCT 116	31,71 ± 0,70%	6,47 ± 0,25%
HT-29	42,51 ± 1,44%	0,69 ± 0,06%
SK-MEL-28	43,17 ± 0,86%	14,26 ± 2,80%
MCF-7	54,34 ± 4,34%	10,99 ± 0,68%
LoVo	70,81 ± 0,36%	3,58 ± 0,79%

Legenda: A viabilidade celular foi medida pelo ensaio MTT. Os dados foram expressos como % de viabilidade celular ± EPM, obtidos a partir de um único experimento em quadruplicatas e comparados com seus respectivos grupos controle. HCT 116: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano; HT-29: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano; SK-MEL-28: linhagem celular de melanoma humano; MCF-7: linhagem celular de adenocarcinoma mamário; LoVo: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal metastático.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme observado na **Tabela 1**, as células HCT 116 apresentaram maior sensibilidade ao EEP-Av que reduziu a viabilidade celular, em comparação ao grupo controle (99,97 ± 1,99%), em 68,3% na menor concentração testada e 93,5% na maior. Em células HT-29 (Controle: 100,0 ± 2,71%), nas concentrações de 25 e 100 µg/mL a viabilidade celular foi diminuída em 57,5% e 99,3%,

respectivamente, enquanto que em células SK-MEL-28 (Controle: $100,0 \pm 1,85\%$), foram observadas reduções de 56,8% e 85,7%, respectivamente. Na linhagem MCF-7 foi constatado 45,6% (25 $\mu\text{g/mL}$) e 88,9% (100 $\mu\text{g/mL}$) de declínio quanto ao controle ($99,98 \pm 0,98\%$), e cerca de 29,1% e 96,4% em células LoVo (Controle: $99,99 \pm 2,64\%$).

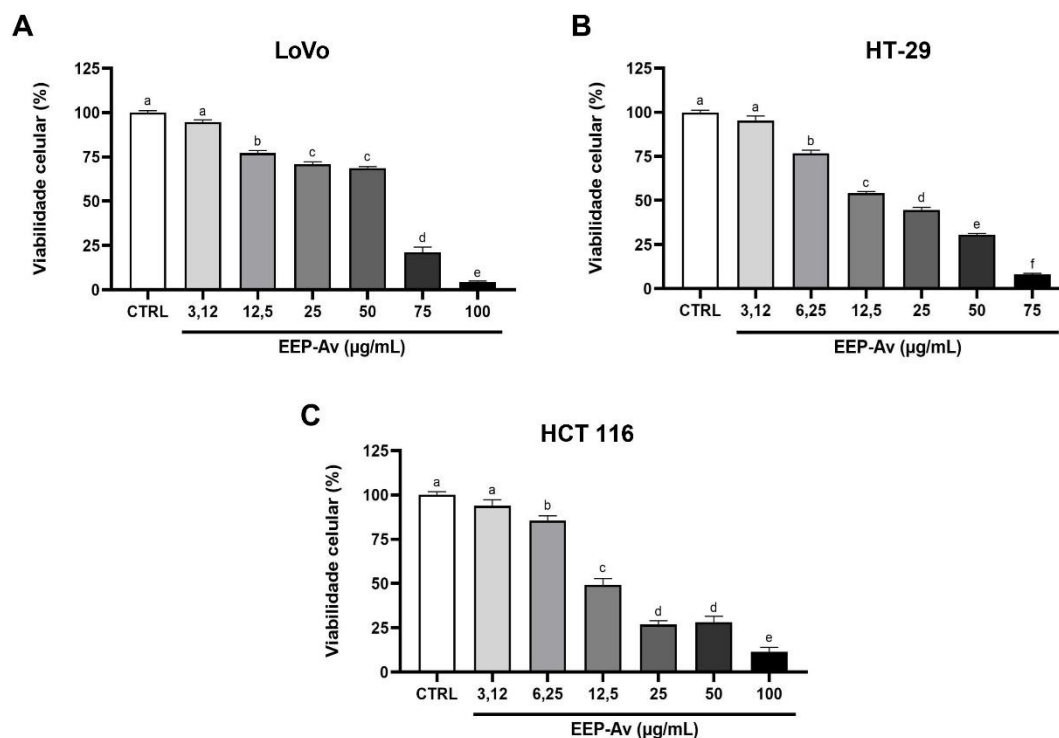
Diante destes dados, as linhagens de câncer colorretal HCT 116 e HT-29 se sobressaíram em relação às demais, quando se compara o percentual de redução da viabilidade nas duas concentrações testadas. A linhagem LoVo apresentou elevada citotoxicidade (96,7%) apenas na maior concentração testada (100 $\mu\text{g/mL}$).

Apesar da linhagem SK-MEL-28 (56,8%) ter apresentado sensibilidade semelhante a HT-29 (57,2%), em 25 $\mu\text{g/mL}$, observou-se que 100 $\mu\text{g/mL}$ não foi suficiente para induzir máximo efeito, ao compararem-se às linhagens de CCR (HCT 116, HT-29 e LoVo). Portanto, as células de câncer colorretal foram escolhidas para a realização de curvas de concentração-resposta do EEP-Av no tempo máximo de 72 horas de incubação.

Ao avaliarem-se os efeitos de EEP-Av sobre as linhagens de adenocarcinoma colorretal, após 72 horas de tratamento, observou-se uma significativa citotoxicidade ($p < 0,05$) em LoVo, a partir da concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, obtendo-se o efeito máximo em 100 $\mu\text{g/mL}$. Já em HT-29 e HCT 116, o declínio significativo foi a partir de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, com máxima resposta em 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (**Figura 8**).

No tempo máximo de tratamento, o EEP-Av obteve CI_{50} de $46,76 \pm 8,59$ $\mu\text{g/mL}$ em LoVo e $17,61 \pm 2,27$ $\mu\text{g/mL}$ em HT-29. A CI_{50} mais baixa, $15,49 \pm 2,28$ $\mu\text{g/mL}$, foi em HCT 116, demonstrando ser a linhagem mais sensível ao extrato. Diante dos dados apresentados na **Figura 8**, apenas a HCT 116 foi escolhida para dar continuidade à investigação do efeito citotóxico, em outros tempos de tratamento, e mecanismo de ação do composto.

Figura 8. Citotoxicidade do EEP-Av frente a linhagens celulares de câncer colorretal humano (LoVo, HT-29 e HCT 116) após 72 h de tratamento

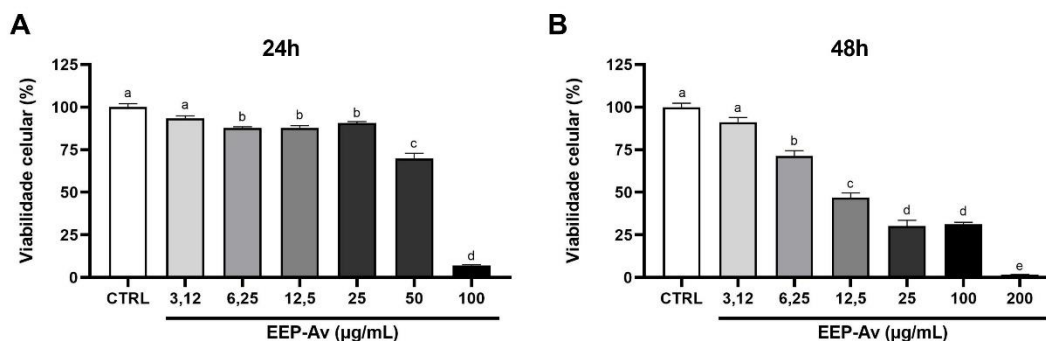


Legenda: Viabilidade celular (%) das células **(A)** LoVo (adenocarcinoma colorretal humano metastático), **(B)** HT-29 (adenocarcinoma colorretal) e **(C)** HCT 116 (adenocarcinoma colorretal), após 72 h de exposição a diferentes concentrações do EEP-Av. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido pelo teste estatístico Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na sequência, foi avaliado o perfil de citotoxicidade do extrato em outros tempos de incubação em HCT 116. Constatou-se que o EEP-Av induziu efeito citotóxico expressivo dependente de concentração, com redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular, em comparação ao grupo controle, observada a partir da concentração de 6,25 µg/mL em cada tempo de tratamento, atingindo o efeito máximo em 100 ou 200 µg/mL em 24 e 48 horas, respectivamente. A partir desses dados, foram obtidas CI_{50} de $59,53 \pm 5,9$ µg/mL e $14,66 \pm 3,49$ µg/mL após 24 e 48 horas de incubação, respectivamente (**Figura 9**).

Figura 9. Citotoxicidade do EEP-Av frente a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (HCT 116) após 24 e 48 h de tratamento

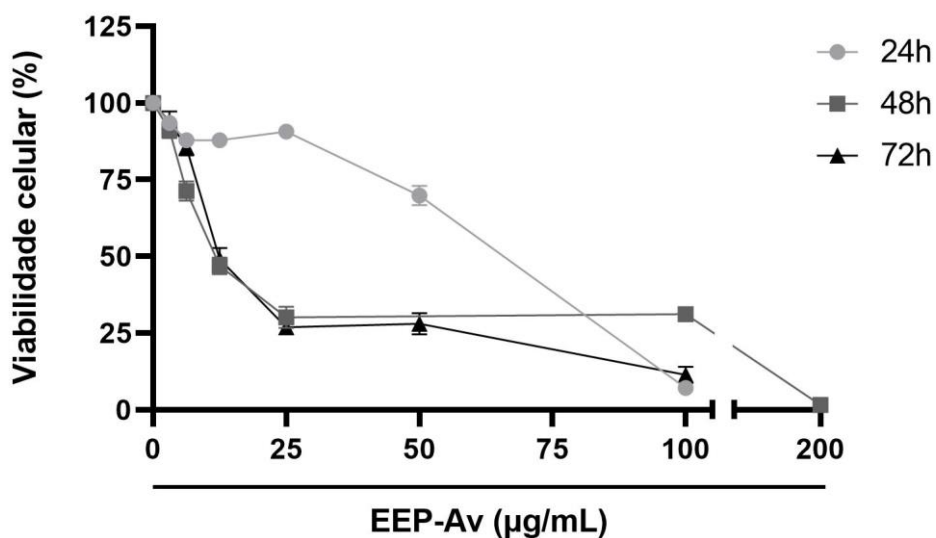


Legenda: Viabilidade celular (%) da linhagem HCT 116 após (A) 24 e (B) 48 horas de exposição a diferentes concentrações do EEP-Av. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido pelo teste estatístico Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, avaliou-se a influência do tempo de incubação do EEP-Av sobre o efeito citotóxico em células HCT-116 em diferentes períodos de tratamento (24, 48 e 72 horas). A partir da **Figura 10**, observa-se uma sobreposição dos efeitos do EEP-Av nos tempos de 48 e 72 horas em concentrações inferiores a 50 µg/mL. Em contrapartida, em 24 horas, essas mesmas concentrações não demonstraram a mesma eficiência, indicando a necessidade de um tempo adicional para alcançar o mesmo efeito. Dessa forma, sugere-se uma dependência temporal para o efeito citotóxico.

Figura 10. Curvas concentração-resposta de diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72 h) com variadas concentrações do EEP-Av em células HCT 116



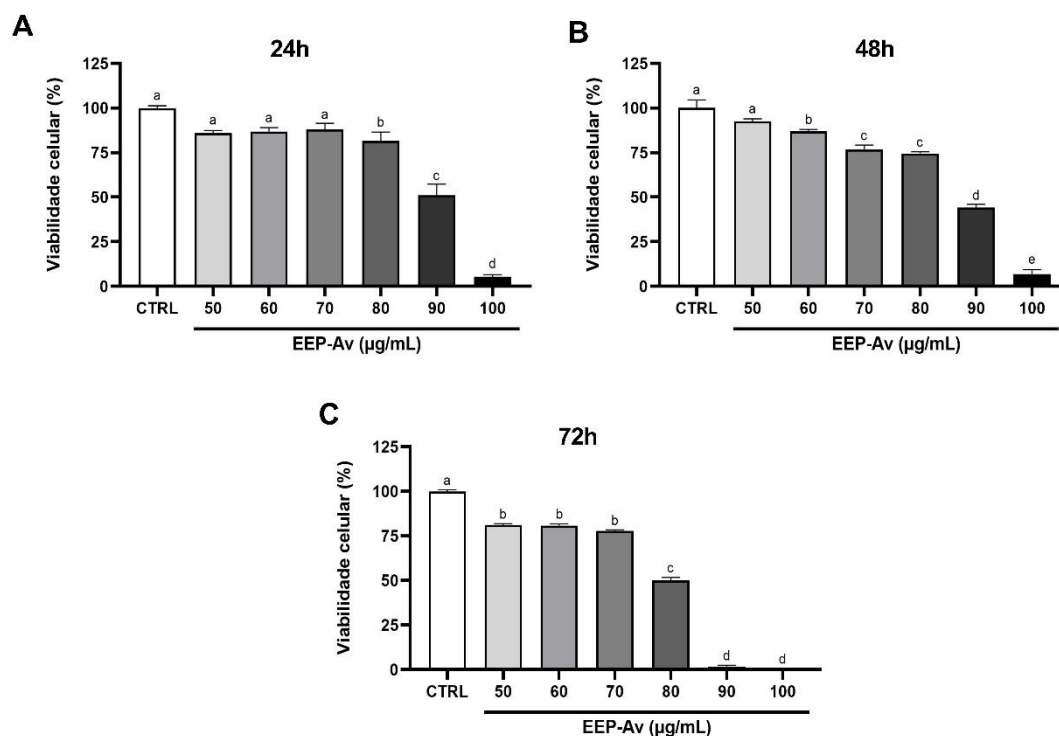
Legenda: Viabilidade celular (%) da linhagem HCT 116 em função de diferentes concentrações do EEP-Av nos tempos de 24, 48 e 72 h de tratamento. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em triplicatas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na subsequente etapa do estudo, avaliou-se uma possível toxicidade do EEP-Av sobre uma linhagem não tumoral de queratinócitos adultos humanos (HaCaT). De acordo com os resultados apresentados na **Figura 11**, foi visto que em 24 e 48 horas houve declínio significativo ($p < 0,05$) na viabilidade celular apenas a partir de 60 µg/mL, e efeito total em 100 µg/mL.

Já no maior período de exposição, 72 h, a redução foi significativa a partir de 50 µg/mL, atingindo o efeito máximo em 90 µg/mL. Em soma, o extrato obteve Cl_{50} , em HaCaT, de $88,82 \pm 1,98$ µg/mL, $85,62 \pm 2,42$ µg/mL e $77,55 \pm 2,50$ µg/mL após a exposição por 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

Figura 11. Citotoxicidade do EEP-Av frente a linhagem celular humana de queratinócitos sadios (HaCaT) após 24, 48 e 72 h de tratamento



Legenda: Viabilidade celular (%) da linhagem celular humana de queratinócitos adultos sadios (HaCaT) após (A) 24, (B) 48 e (C) 72 horas de exposição a diferentes concentrações do EEP-Av. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido pelo teste estatístico Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nos valores de CI_{50} obtidos, foi então calculado o índice de seletividade (IS) do EEP-Av nos diferentes tempos de tratamento, utilizando a linhagem não tumoral como parâmetro de comparação com as células tumorais.

A **Tabela 2** mostra que, em células HCT 116, a partir de 24 h o extrato apresentou citotoxicidade superior em células cancerígenas do que em sadias ($IS > 1$), sendo 1,49 vezes mais seletivo. Após 48 h de incubação, o composto foi 5,84 vezes mais seletivo, e em 72 h esse índice foi de 5,0. No período máximo de tratamento (72 h) em células HT-29 ($IS: 4,4$) e LoVo ($IS: 1,65$), o composto também exibiu maior efeito farmacológico específico em células neoplásicas (IS

> 1), porém com IS inferiores ao encontrado na linhagem HCT 116, como destaca a **Tabela 2**.

Tabela 2. Valores de CI_{50} e IS do EEP-Av em linhagens celulares tumorais de câncer colorretal (HCT 116, HT-29 e LoVo) e não tumoral HaCaT no período de 24, 48 e/ou 72 h de tratamento

Linhagens celulares	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			IS		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
HCT 116	59,53 $\pm$ 5,9	14,66 $\pm$ 3,49	15,49 $\pm$ 2,28	1,49	5,84	5,00
HT-29	-	-	17,61 $\pm$ 2,27	-	-	4,40
LoVo	-	-	46,76 $\pm$ 8,59	-	-	1,65
HaCaT	88,82 $\pm$ 1,98	85,62 $\pm$ 2,42	77,55 $\pm$ 2,50	-	-	-

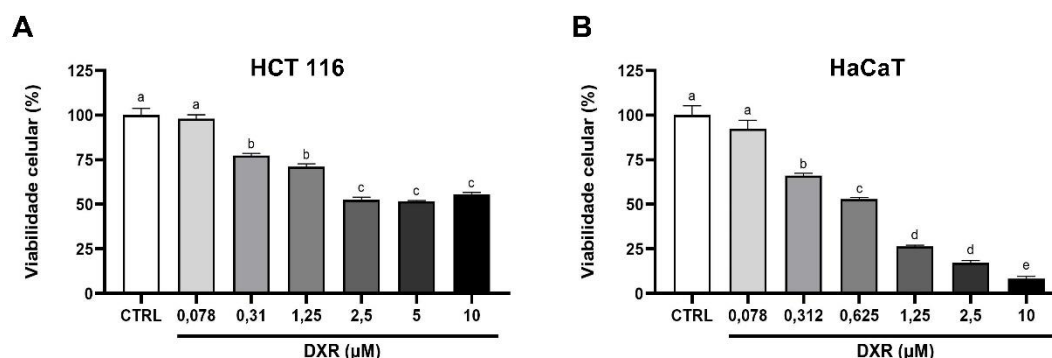
Legenda: Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas, apresentados como valores de CI_{50} obtidos por regressão não linear. HCT 116: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano; HaCaT: linhagem celular de queratinócitos humanos saudáveis; LoVo: adenocarcinoma colorretal humano metastático; HT-29: adenocarcinoma colorretal; CI_{50} : concentração inibitória média; IS: índice de seletividade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em vista disso, uma vez que os valores de CI_{50} obtidos em 48 e 72 h de exposição não exibiram diferença significativa (**Tabela 2**), a concentração do extrato referente a 48 h, bem como esse tempo de incubação, foram escolhidos para os ensaios posteriores do estudo.

Para fins comparativos de eficácia e seletividade do EEP-Av sobre a linhagem HCT 116, utilizou-se a droga padrão doxorrubicina (DXR), no período de tratamento de 48 h, conforme explicado anteriormente. A DXR apresentou acentuado efeito citotóxico dependente de concentração, sendo mais potente em células saudáveis HaCaT, com CI_{50} de 0,64 $\pm$ 0,98 μM , do que em células cancerígenas HCT 116, com CI_{50} de 4,30 $\pm$ 0,99 μM . Em ambas as linhagens, o efeito citotóxico foi significativo ($p < 0,05$) a partir de 0,312 μM , enquanto que em HaCaT o extrato atingiu seu efeito máximo em 10 μM , o que não foi visto em HCT 116, na qual a droga formou um platô nas maiores concentrações avaliadas (**Figura 12**).

Figura 12. Citotoxicidade de DXR frente às linhagens de células humanas de adenocarcinoma colorretal (HCT 116) e queratinócitos sadios (HaCaT) após 48 h de tratamento



Legenda: Viabilidade celular (%) da linhagem celular humana (A) HCT 116 (adenocarcinoma colorretal) e (B) HaCaT (queratinócitos sadios) após 48 horas de exposição a diferentes concentrações de doxorrubicina (DXR). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido pelo teste estatístico Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre as condições ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com o IS calculado, após 48 h o controle positivo DXR apresentou índice de seletividade de 0,14 (**Tabela 3**). Em comparação por esse parâmetro, o EEP-Av apresentou 41,71 vezes mais seletividade às células tumorais HCT 116 do que a DXR, no mesmo período de incubação.

Tabela 3. Valores de CI_{50} e IS de DXR em linhagem celular tumoral HCT 116 e não tumoral HaCaT no período de 48 h de tratamento

Linhagens celulares	CI_{50} (μM)	IS
HCT 116	4,30 $\pm$ 0,99	0,14
HaCaT	0,64 $\pm$ 0,98	-

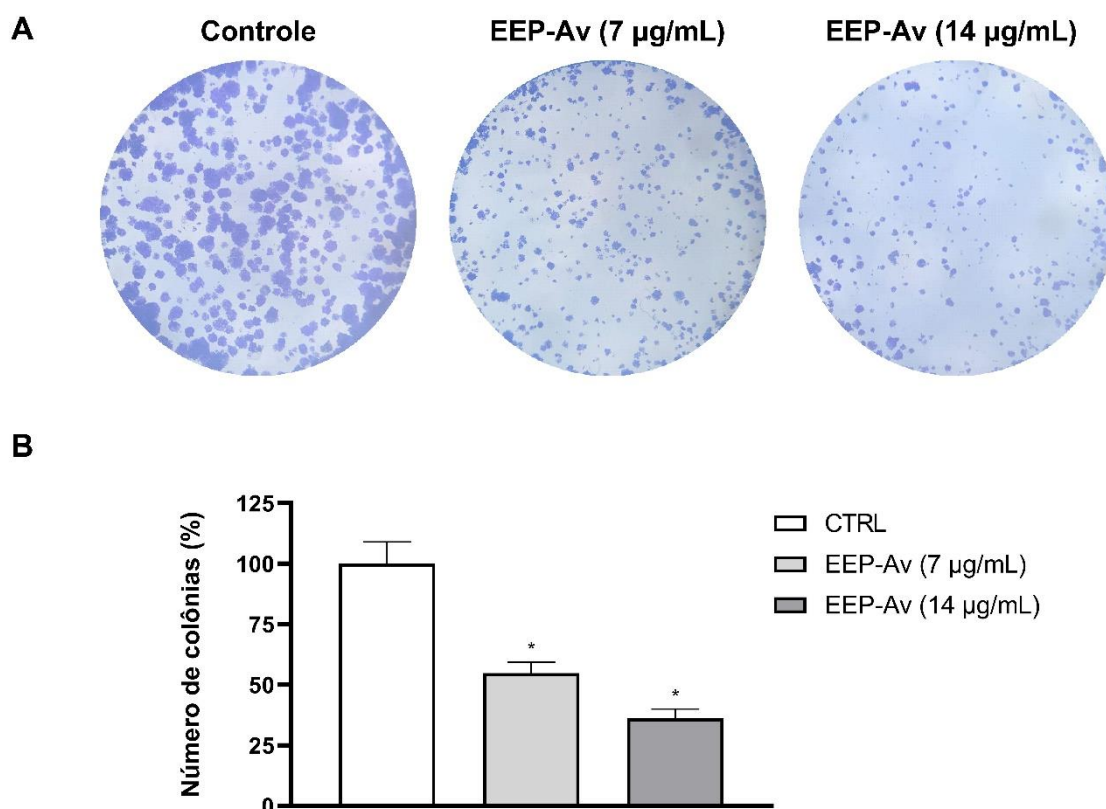
Legenda: Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), obtidos a partir de três experimentos independentes em triplicatas, apresentados como valores de CI_{50} obtidos por regressão não linear. HCT 116: linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano; HaCaT: linhagem celular de queratinócitos humanos sadios; DXR: doxorrubicina; CI_{50} : concentração inibitória média; IS: índice de seletividade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Efeito do EEP-Av na formação de colônias de células HCT 116

A partir do ensaio de clonogenicidade, constatou-se que o EEP-Av inibiu significativamente a formação de colônias de células de câncer colorretal HCT 116, após 48 horas de tratamento com a CI_{50} (14 $\mu\text{g/mL}$) e metade (7 $\mu\text{g/mL}$), quando comparados ao grupo controle (**Figura 13**).

Figura 13. Efeito inibitório do EEP-Av na formação de colônias de células de adenocarcinoma colorretal humano (HCT 116)



Legenda: (A) Colônias observadas em estereomicroscópio, e sua (B) quantificação (%), da linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (HCT 116) após a exposição de 48 h à CI_{50} (14 $\mu\text{g/mL}$) e metade (7 $\mu\text{g/mL}$) do EEP-Av, cultivadas por 7 dias no total. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em duplicatas, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido pelo teste estatístico Dunnet. *: $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (não tratado).

Fonte: Elaborado pelo autor.

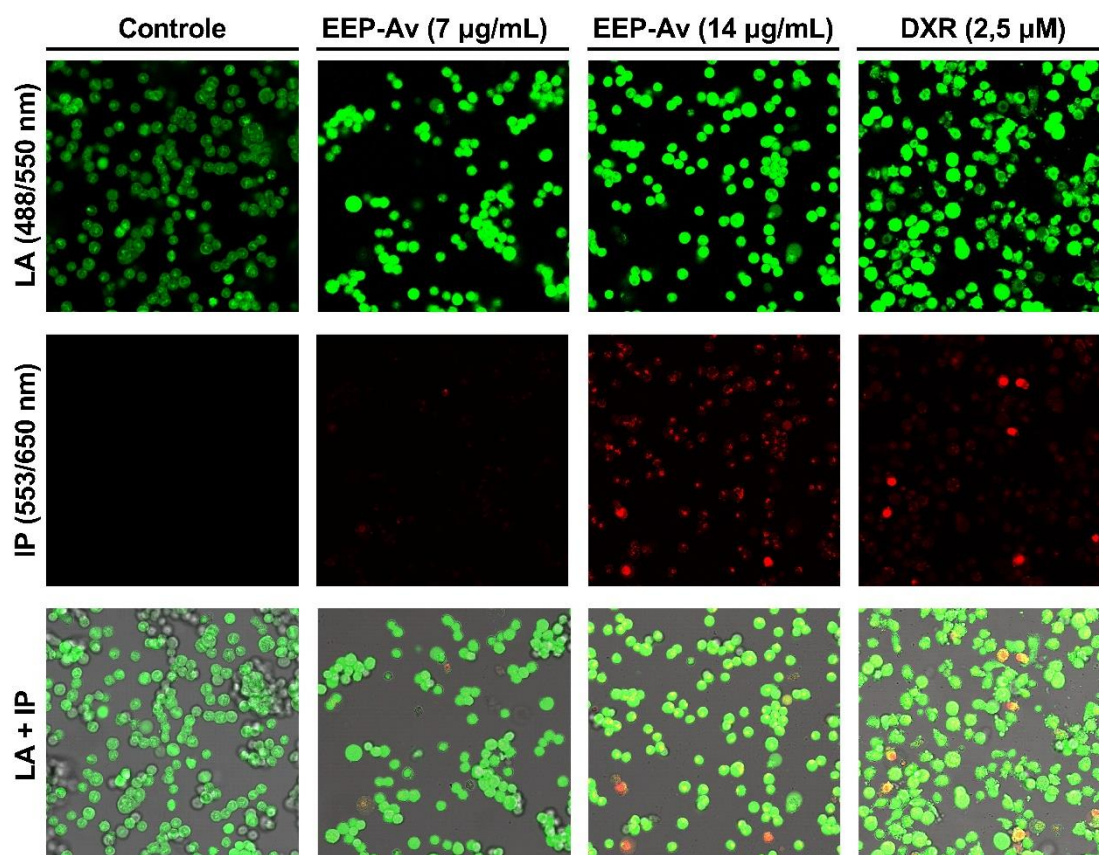
Na **Figura 13a**, é possível observar, a partir de análise qualitativa, que nos grupos de tratamento com o extrato houve uma redução tanto na quantidade de colônias formadas quanto no tamanho das mesmas. Diante do tratamento

estatístico, de $100,0 \pm 9,02\%$ de colônias formadas no grupo controle (não tratado), a CI_{50} reduziu significativamente esse percentual para $36,24 \pm 3,85\%$ ($p < 0,05$), enquanto que a metade dessa concentração reduziu para $54,80 \pm 4,63\%$ ($p < 0,05$), porém não houve diferença significativa entre os dois grupos de tratamento (**Figura 13b**).

5.3 Tipo de morte celular induzida por EEP-Av em células HCT 116, avaliada por dupla marcação de laranja de acridina e iodeto de propídio

Na **Figura 14** é mostrado imagens representativas das células HCT 116 marcadas com os corantes fluorescentes laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP), após a exposição por 48 horas com a CI_{50} ($14 \mu\text{g/mL}$) e metade ($7 \mu\text{g/mL}$) do EEP-Av, e o controle positivo doxorrubicina ($2,5 \mu\text{M}$). É possível observar diferenças entre a fluorescência e coloração das células dos grupos tratados e o controle, caracterizando a presença do processo de morte celular.

Figura 14. Fotomicrografias representativas da avaliação de apoptose/necrose do EEP-Av e DXR em células HCT 116, marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) e observadas em microscopia confocal após 48 h

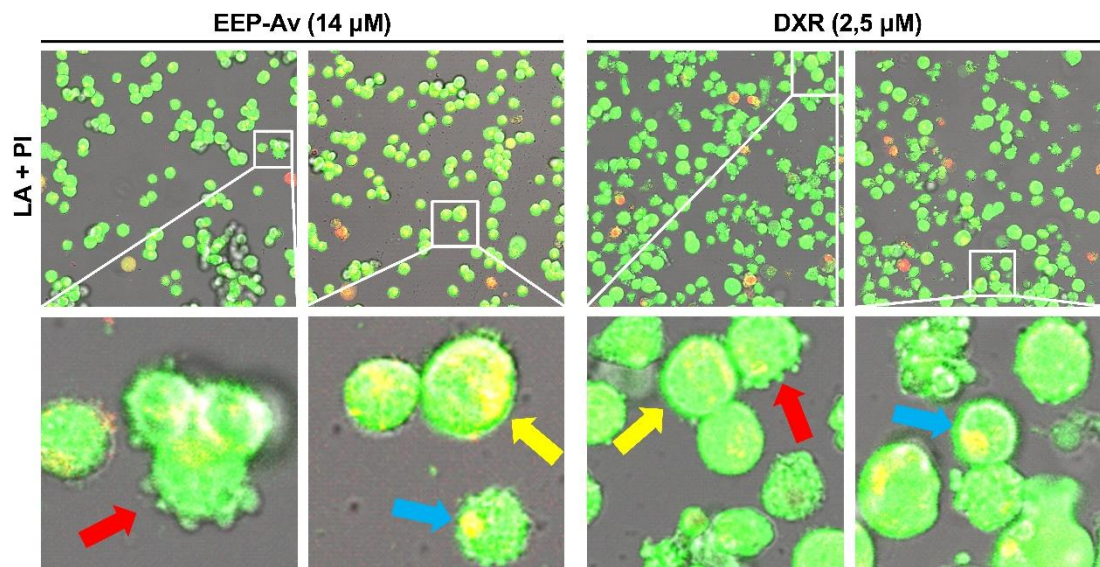


Legenda: Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a *laser* de células HCT 116 marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP), após a exposição de 48 h ao EEP-Av (14 e 7 µg/mL) e DXR (2,5 µM). Células viáveis foram coradas de verde claro, enquanto que as células em apoptose inicial revelaram núcleo verde brilhante de condensação de cromatina. Células em apoptose tardia apresentaram áreas alaranjadas densas (verde/vermelho), e as necróticas exibiram núcleos vermelhos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na **Figura 15**, são vistas alterações morfológicas nas células HCT 116 que são características do processo de morte celular programada apoptose, como a formação de *blebs* (ou bolhas) de membrana, a fragmentação do material genético e condensação de cromatina. Esses aspectos são visíveis tanto em células tratadas com o extrato, quanto no controle positivo doxorrubicina.

Figura 15. Fotomicrografias de microscopia confocal das alterações morfológicas do processo de morte apoptótica em células HCT 116, marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) após tratamento por 48 h com EEP-Av e DXR



Legenda: Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de células HCT 116 marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP), após a exposição de 48 h ao EEP-Av (14 e 7 µg/mL) e DXR (2,5 µM). As setas vermelhas apontam a formação de *blebs* de membrana, enquanto que as setas amarelas e azuis mostram a fragmentação de DNA e a condensação de cromatina, respectivamente.

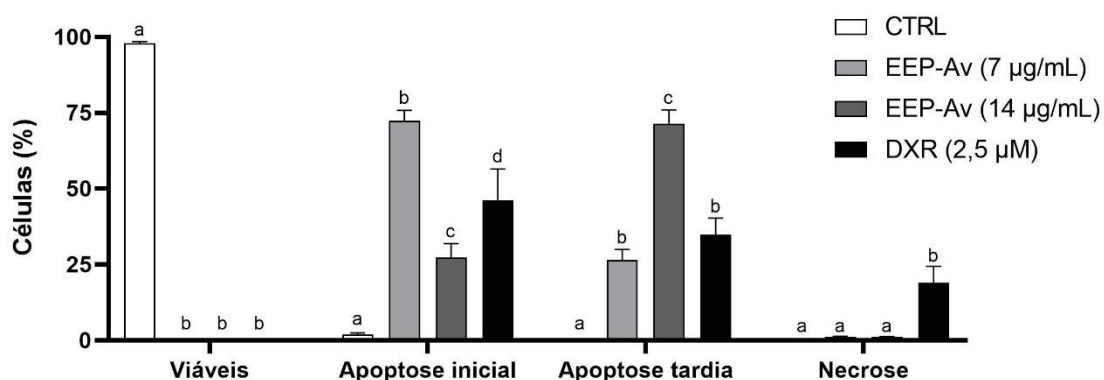
Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 16** demonstra o percentual de células HCT 116 em diferentes estágios (viáveis, apoptose inicial, tardia e necrose) após o tratamento por 48 h com a CI_{50} (14 µg/mL) do EEP-Av e 2,5 µM do controle positivo DXR, a partir da marcação com LA e IP.

Foi indicado que a incubação com 7 µg/mL e 14 µg/mL aumentaram significativamente o percentual de células em apoptose inicial de $1,95 \pm 0,5\%$ do controle, para $72,33 \pm 3,45\%$ e $27,39 \pm 4,46\%$ ($p < 0,05$), respectivamente, enquanto que DXR elevou para $46,19 \pm 10,25\%$ ($p < 0,05$). O número de células em apoptose tardia também aumentou significativamente de $0,00 \pm 0,00\%$, do grupo controle, para $26,41 \pm 3,51$ e $71,44 \pm 4,49\%$ ($p < 0,05$), respectivamente. Nesse estágio, DXR também elevou a porcentagem para $34,91 \pm 5,37\%$ ($p < 0,05$).

A taxa de células em necrose para ambas concentrações do EEP-Av foi de $1,14 \pm 0,17\%$ e $1,06 \pm 0,16\%$, respectivamente, não havendo aumento significativo em relação ao controle ($0,19 \pm 0,19\%$, $p < 0,05$). Em contrapartida, DXR apresentou aumento significativo de $18,89 \pm 5,45\%$ ($p < 0,05$).

Figura 16. Percentual de células HCT 116 marcadas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) em diferentes estágios morfológicos após tratamento por 48 h com EEP-Av e DXR



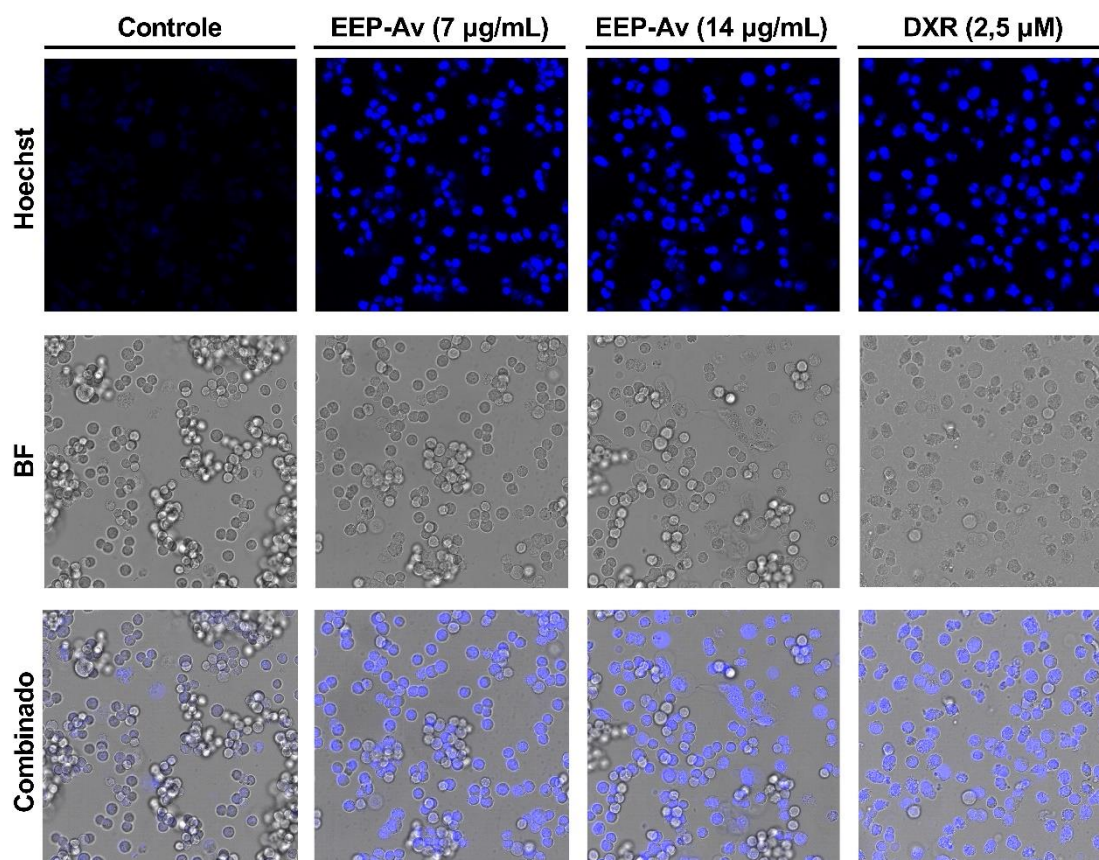
Legenda: Taxas de células HCT 116 coradas com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) distribuídas em estágios morfológicos como viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido pelo teste estatístico Tukey. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos experimentais de cada condição ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Alterações nucleares promovidas por EEP-Av em HCT 116 coradas com Hoechst 34580

Na **Figura 17** é representado a fluorescência azul emitida pelas células tratadas (EEP-Av e DXR) e não tratadas, após a marcação com a sonda fluorescente Hoechst 34580. Nos grupos tratados foram identificadas anormalidades no núcleo celular que são indicadores de apoptose, como condensação da cromatina e picnose nuclear, quando comparado com o controle (não tratado).

Figura 17. Fotomicrografias representativas das alterações nucleares induzidas por EEP-Av e DXR em células HCT 116, marcadas com Hoechst 34580 e observadas em microscopia confocal após 48 h

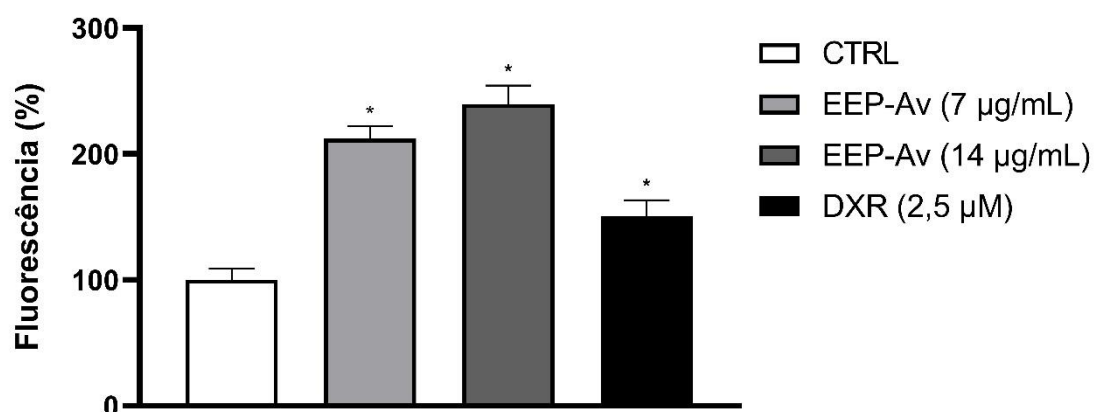


Legenda: As células HCT 116 foram tratadas por 48 h com EEP-Av (14 e 7 µg/mL) e DXR (2,5 µM), sendo então coradas com Hoechst 34580. A análise foi realizada por microscopia confocal a laser, utilizando um laser de 405 nm e registrando a emissão na faixa de 410-600 nm. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os grupos de células tratadas com a CI_{50} (14 µg/mL) e metade (7 µg/mL) tiveram um aumento significativo no percentual da intensidade de fluorescência, de $100,0 \pm 9,14\%$ do grupo controle para $239,5 \pm 14,81\%$ e $212,0 \pm 10,06\%$ ($p < 0,05$), respectivamente. O controle positivo DXR também aumentou significativamente para $150,9 \pm 12,45\%$ ($p < 0,05$) (**Figura 18**).

Figura 18. Percentual de fluorescência de células HCT 116 após 48 h de exposição ao EEP-Av e DXR e marcadas com Hoechst 34580



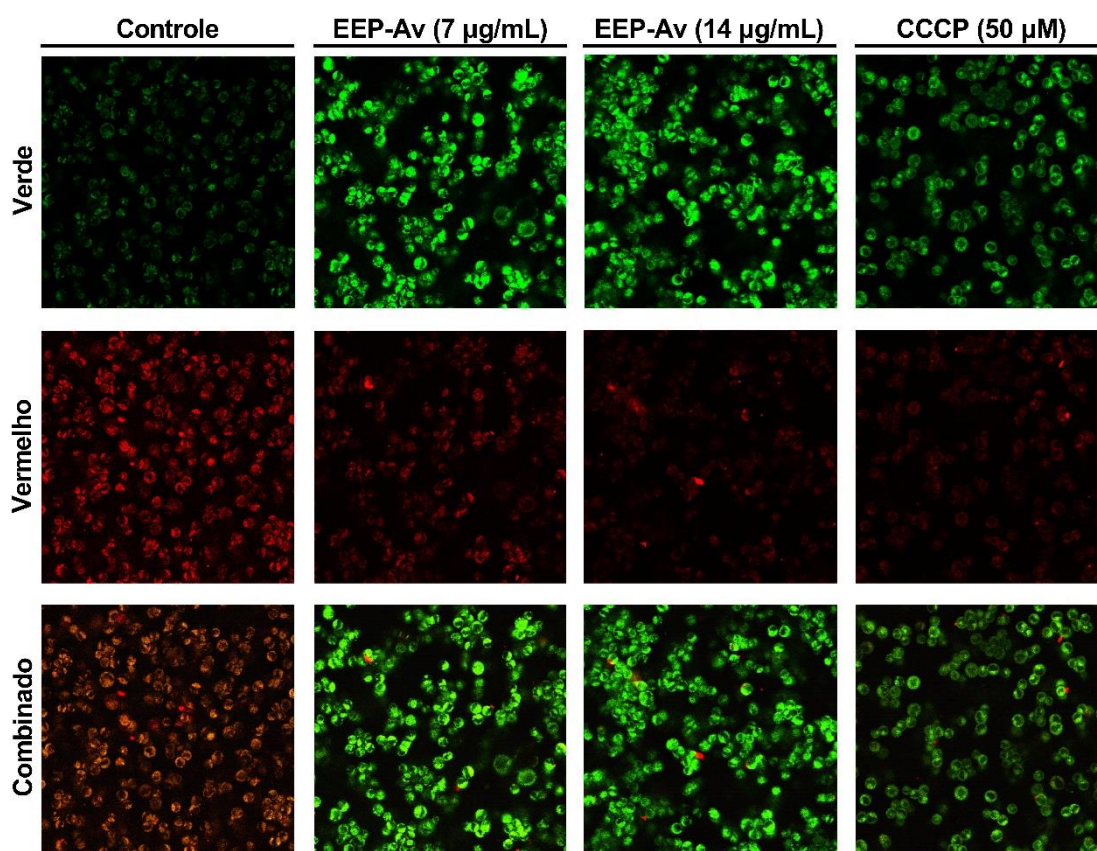
Legenda: Percentual de células HCT 116 marcadas com Hoechst 34580. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido pelo teste estatístico Dunnet. *: $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (não tratado).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Efeito do EEP-Av no potencial de membrana mitocondrial de células HCT 116 marcadas com JC-1

Na **Figura 19**, observam-se fotomicrografias de microscopia confocal a laser do ensaio JC-1 em células HCT 116. Nota-se que a fluorescência vermelha de moléculas agregadas de JC-1 foi mais intensa que a verde (forma livre), indicando a presença de mitocôndrias viáveis com alta polarização, observadas em maior grau no grupo controle. Adicionalmente, identificou-se um aumento na fluorescência verde e uma diminuição na fluorescência vermelha nos grupos de tratamento com o EEP-Av e o controle positivo CCCP (cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona), sugerindo que as células perderam o potencial de membrana mitocondrial e que acumularam o JC-1 em sua forma monomérica.

Figura 19. Fotomicrografias representativas da avaliação do potencial de membrana mitocondrial de células HCT 116 tratadas com EEP-Av e CCCP por 48 h e marcadas com JC-1

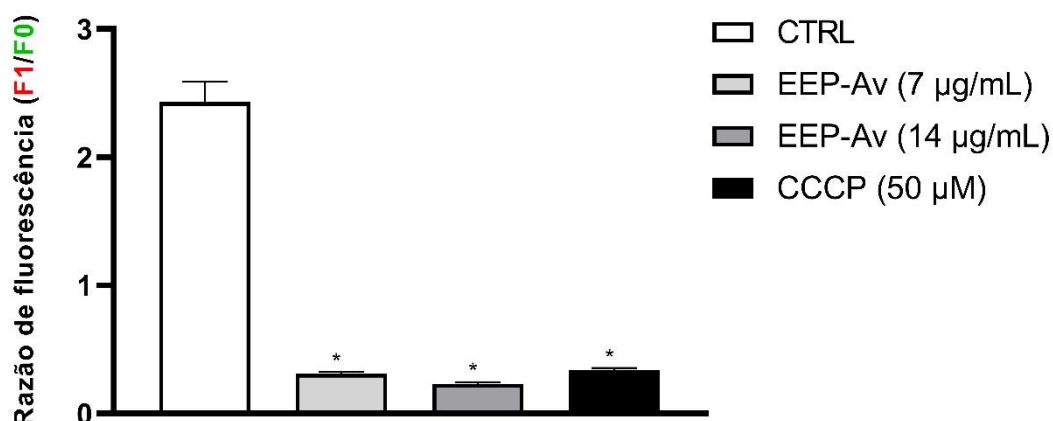


Legenda: As células HCT 116 foram tratadas por 48 h com EEP-Av (14 e 7 µg/mL) e CCCP (50 µM) como controle positivo, sendo então marcadas com JC-1. A análise foi realizada por microscopia confocal a laser, utilizando um laser de 488 nm e registrando a emissão na faixa de 520-542 e 580-614 nm. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 20** expressa de forma quantitativa a razão entre as moléculas agregadas de JC-1 (F1) e as moléculas em sua forma livre (F0), após a exposição por 48 h ao EEP-Av (14 e 7 µg/mL) e ao controle positivo CCCP (50 µM). A razão para o controle foi de $2,43 \pm 0,16$, que reduziu significativamente ($p < 0,05$) para $0,31 \pm 0,02$ (7 µg/mL), $0,23 \pm 0,01$ (14 µg/mL) e $0,34 \pm 0,02$ (CCCP) nos grupos de tratamento. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos de tratamento com o extrato ou com o controle positivo.

Figura 20. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de células HCT 116 após 48 h de exposição ao EEP-Av e CCCP e marcação com JC-1



Legenda: Razão de fluorescência entre JC-1 agregado (F1)/JC-1 livre (F0). Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido pelo teste estatístico Dunnett. *: $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (não tratado).

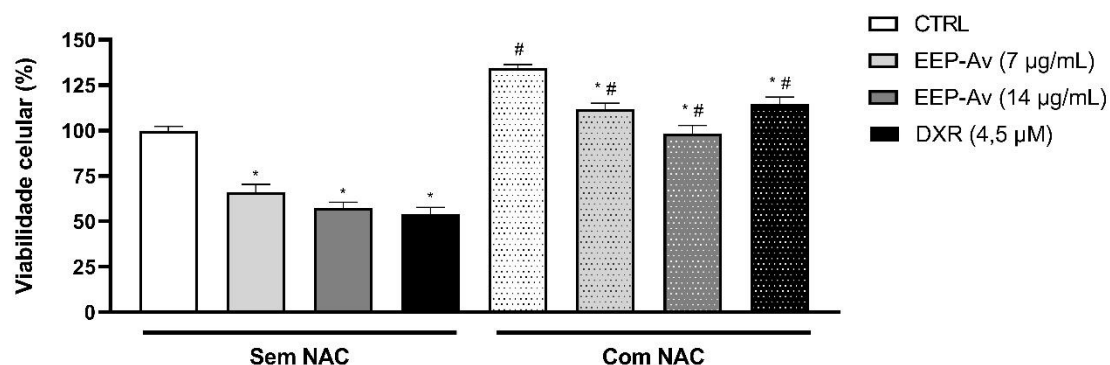
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6 Citotoxicidade por estresse oxidativo induzido por EEP-Av e DXR em células HCT 116 na presença ou ausência de NAC

De acordo com a **Figura 21**, no grupo experimental com ausência de N-acetilcisteína (NAC) a viabilidade celular foi reduzida, após 48 h, de $99,99 \pm 2,29\%$ do grupo controle para $65,89 \pm 4,42\%$ (7 µg/mL) e $57,46 \pm 3,12\%$ (14 µg/mL) ($p < 0,05$) nos grupos de tratamento com o EEP-Av. A CI_{50} de DXR em (4,5 µM) apresentou $53,95 \pm 3,74\%$ ($p < 0,05$) de viabilidade. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos de tratamento com EEP-Av e DXR. Por outro lado, no grupo experimental com a presença de NAC, o percentual de viabilidade do grupo controle foi de $134,4 \pm 1,98\%$, reduzido a $111,7 \pm 3,39\%$, $98,22 \pm 4,53\%$ e $114,7 \pm 3,79\%$ ($p < 0,05$) para EEP-Av (7 e 14 µg/mL) e DXR, respectivamente.

Em comparação com as duas formas experimentais, o grupo pré-tratado com NAC por 3h, preveniu significativamente ($p < 0,05$) a morte celular nos grupos de tratamento, com diferenças de viabilidade celular de 40,76%, 45,82% e 60,72% para 14 µg/mL, 7 µg/mL e DXR, respectivamente.

Figura 21. Citotoxicidade do EEP-Av em células HCT 116 após 48 h de tratamento com EEP-Av e DXR, na ausência ou presença de N-acetilcisteína (NAC)



Legenda: Viabilidade celular (%) da linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano (HCT 116) após 48 h de incubação com EEP-Av (14 e 7 µg/mL) e DXR (4,5 µM). Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes em triplicatas, analisados por Análise de Variância (ANOVA) *one way* seguido pelo teste estatístico Tukey. *: $p < 0,05$ quando comparado com o controle de seu respectivo grupo; #: $p < 0,05$ quando comparado o grupo sem NAC e com NAC.

Fonte: Elaborado pelo autor.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A etnofarmacologia é fundamental na descoberta de novos fármacos, dado que o uso de muitas substâncias bioativas atuais são provenientes dos saberes tradicionais de manipulação de produtos naturais (Marrelli, 2021).

Os efeitos terapêuticos provenientes de extratos, óleos vegetais e frações obtidas de plantas medicinais são associados às substâncias orgânicas bioativas denominadas de metabólitos secundários, componentes da constituição fitoquímica (Li *et al.*, 2020). Diferentes extratos da espécie *A. vepretorum* são compostos por distintas classes de metabólitos secundários, como flavonoides, terpenos, alcaloides, antocianinas, naftoquinonas, esteroides, polifenóis, taninos e saponinas (Diniz *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2017).

O grupo de pesquisa que cedeu o extrato éter de petróleo das cascas do caule de *A. vepretorum*, objeto de estudo deste trabalho, realizou a caracterização química de um exemplar coletado na mesma localização da cidade de Poço Redondo, Sergipe, Brasil. Foram encontrados diterpenos *ent*-caurano, destacando-se o inédito *ent*-3 β -hidroxi-caur-16-en-19-al, além de outros diterpenos conhecidos como o majoritário do extrato *ent*-3 β -hidroxi-caur-16-eno. A citotoxicidade dos diterpenos foi avaliada em células de leucemia mielocítica crônica humana (K562), leucemia promielocítica humana (HL-60), carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e melanoma de camundongo (B16-F10), sendo o *ent*-caurano inédito o composto mais ativo contra células K562 (Cl₅₀: 8,24 μ M) (Dutra *et al.*, 2014a; Costa *et al.*, 2020).

Apesar dos efeitos isolados dessas substâncias, a literatura reporta que interações sinérgicas entre vários componentes presentes em um extrato possuem benefícios por torná-lo mais eficaz no tratamento de doenças (Caesar; Cech, 2019).

Adicionalmente, uma abordagem alternativa do emprego de produtos naturais com efeito antitumoral é a exploração do sinergismo com drogas usuais na clínica, visando aumentar especificidade, eficácia e reduzir a toxicidade, reforçando a importância da exploração e versatilidade dessa classe de compostos (Surek *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023).

Vislumbrando o potencial farmacológico, o presente trabalho se propôs a avaliar o efeito antitumoral *in vitro* do extrato éter de petróleo obtido das cascas

do caule de *Annona vepretorum* Mart. (EEP-Av). Neste sentido, a investigação iniciou-se com a realização de uma triagem farmacológica em linhagens de células tumorais humanas, no período máximo de incubação de 72 horas, objetivando, a princípio, identificar o tipo celular mais sensível à droga. Para isso, foi executado o teste colorimétrico de viabilidade celular com o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), que avalia a capacidade de sobrevivência e funções mitocondriais após exposição a uma substância (Ghasemi *et al.*, 2021).

Os dados percentuais de redução da viabilidade celular mostraram que, a partir de 25 µg/mL, o EEP-Av foi mais citotóxico em células HCT 116, seguida por HT-29, SK-MEL-28, MCF-7 e LoVo. Na maior concentração testada (100 µg/mL), o efeito máximo foi observado apenas nas linhagens de câncer colorretal (CCR) HCT 116, HT-29 e LoVo. Diante desses resultados, sugeriu-se maior sensibilidade das células de CCR ao composto.

Esses resultados corroboram com os dados de Almeida e colaboradores (2014), que demonstraram que 50 µg/mL do extrato etanólico e clorofórmico das folhas de *Annona vepretorum*, promoveram inibição de 100% do crescimento celular em 72 h na linhagem de adenocarcinoma colorretal humano HCT 116, além de uma redução da viabilidade celular de 94,95% pelo extrato hexânico.

De forma semelhante, outro grupo de pesquisa mensurou a inibição da proliferação em células HCT 116 utilizando 50 µg/mL de vários extratos obtidos também das folhas da planta. Após 72 h, o extrato metanólico ($98,16 \pm 0,92\%$), clorofórmico ($74,28 \pm 0,25\%$) e hexânico ($56,04 \pm 21,00\%$) foram os que apresentaram maior inibição do crescimento celular, seguidos pelo extrato hexânico bruto ($29,96 \pm 1,60\%$), acetato de etila ($17,87 \pm 6,45\%$) e o aquoso ($9,52 \pm 11,68\%$) (Silva *et al.*, 2017).

Apenas em 2022 o câncer de cólon e/ou reto, também denominado de câncer colorretal, foi o terceiro tipo da doença mais diagnosticada no mundo. Com mais de 2 milhões de novos casos e quase 1 milhão de mortes, ocupou o segundo lugar entre os tipos de câncer com maior taxa de mortalidade (Bray *et al.*, 2024). Aliado a isso, a terapia do CCR enfrenta desafios significativos devido a problemas de eficácia, resistência aos medicamentos e efeitos adversos, o que estimula a busca por novos tratamentos (Van Den Boogaard; Komninos; Vermeij, 2022).

Em vista disso, a partir da hipótese de maior sensibilidade às células de CCR, foram realizadas curvas de concentração-resposta do EEP-Av em três linhagens diferentes (HCT 116, HT-29 e LoVo) ao longo de 72 h de tratamento, objetivando escolher a mais sensível para dar prosseguimento aos experimentos e ter uma avaliação mais ampla da eficácia do composto em relação a esse tipo de câncer.

As diferenças fenotípicas entre essas células fundamentam o uso concomitante para a exploração da atividade do composto. A linhagem de células imortalizadas de adenocarcinoma de cólon humano, HT-29, possui mutação ativadora no oncogene BRAF que confere resistência aos quimioterápicos. A ocorrência de superexpressão da proteína p53 (Tamura *et al.*, 2023) é encontrada tanto em HT-29 quanto na linhagem de adenocarcinoma de cólon metastático para linfonodos, LoVo, que, por sua vez, apresenta mutação no oncogene KRAS (Wang *et al.*, 2023).

As células derivadas de carcinoma de cólon humano, HCT 116, possuem mutação no gene homólogo humano da proteína MutL 1 (hMLH1), o que compromete o reparo de danos no DNA resultando em instabilidade de microssatélites (MSI) (Koi *et al.*, 1994). Adicionalmente, essas células contêm mutações deletérias no gene supressor de tumor TP53 (p53) e ativadoras no oncogene KRAS, comum em 40-45% dos casos de CCR (Ruffinelli *et al.*, 2021; Kealey *et al.*, 2022).

A proteína KRAS está envolvida em ativação constitutiva da sinalização proliferativa MAPK/ERK, o que torna as células cancerígenas independentes de outras vias para o crescimento. Portanto, casos de CCR com mutações amplificadoras desse oncogene são associados a resistência às terapias anti-EGFR, como o cetuximabe e panitumumabe, tornando linhagens celulares com essas mutações importantes para pesquisas, devido às limitações na terapêutica (Adachi-Fernandez *et al.*, 2023).

Os resultados da avaliação citotóxica do EEP-Av nessas células mostraram que o composto induziu efeito significativo em todas as linhagens, com atividade mais expressiva em HCT 116. Para uma análise mais detalhada da citotoxicidade do extrato nessa linhagem, a viabilidade celular foi então avaliada em outros tempos de exposição (24 e 48 horas).

A análise das curvas concentração-resposta dos diferentes tempos de incubação em HCT 116, revelou que ocorreu intensificação da resposta farmacológica com o aumento na concentração do composto em todos os períodos de tratamento, evidenciando relação de dependência de concentração. Adicionalmente, foi observado que o tempo influencia diretamente na ação citotóxica encontrada, uma vez que é preciso de um período maior para se observar um efeito completo, demonstrando também dependência de tempo.

Contudo, foi encontrado um efeito semelhante entre as curvas de 48 e 72 h, que praticamente se sobrepõem em concentrações inferiores a 50 µg/mL, com maior variação apenas a partir de 100 µg/mL. Esses achados sugerem que, após um certo período, o EEP-Av atinge o efeito máximo, indicando que as células podem ter respondido de maneira semelhante a essas duas exposições. Isso pressupõe que em 48 h a droga pode já ter atingido a maioria dos efeitos possíveis, e a adição de mais 24 h pode não ter resultado em alterações significativas nesta ação, exceto na concentração mais alta. Isso corrobora com a similaridade entre os valores de CI_{50} .

Consequentemente, a linhagem HCT 116 foi a escolhida para dar continuidade à investigação da atividade antitumoral do extrato. Igualmente, a CI_{50} obtida no tempo de tratamento de 48 h ($14,66 \pm 3,49$ µg/mL), e a metade (7 µg/mL), foi selecionada para os experimentos subsequentes, considerando que não houve variação relevante em relação a CI_{50} de 72 h ($15,49 \pm 2,28$ µg/mL), tendo em vista também o objetivo de identificar apenas os processos que levam a indução de morte celular.

Na literatura científica foi reportado que outras espécies do gênero *Annona* também apresentaram efeitos antitumorais contra as mesmas linhagens celulares de CCR investigadas neste trabalho. Rao *et al.* (2024) apontaram que, após 48 h, a fração éter de petróleo das folhas de *Annona reticulata* obteve CI_{50} de 29,07 µg/mL em HCT 116. Outro exemplo é o extrato acetato de etila das folhas de *Annona muricata* com proeminente atividade antineoplásica em HCT 116 (CI_{50} : 11,43 µg/mL) e HT-29 (CI_{50} : 8,98 µg/mL) após 24 h (Moghadamtousi *et al.*, 2014).

Apesar da ressecção cirúrgica ser a principal modalidade de tratamento do CCR em estágio inicial, a quimioterapia é um dos métodos terapêuticos mais utilizados, seja como primeira linha ou associada a outras técnicas, incluindo a

cirurgia (Krasteva; Georgieva, 2022). Essa terapia sistêmica é recomendada para pacientes que não podem ser submetidos a cirurgia, e em especial em quadros de metástase e recorrência (Hossain *et al.*, 2022).

No entanto, a quimioterapia apresenta desvantagens devido a sua inespecificidade às células cancerígenas (Zeien *et al.*, 2022). De modo geral, esses agentes citotóxicos induzem morte em células com altas taxas proliferativas, o que inclui, além das células neoplásicas, as sadias de tecidos como a medula óssea, os folículos pilosos e a mucosa gastrointestinal, resultando em efeitos adversos como mielossupressão, alopecia, náuseas, vômitos e diarreia (Sun *et al.*, 2021). Apesar de reduzir o volume da massa tumoral e aumentar a expectativa de vida, a toxicidade produzida pelas drogas da clínica oncológica atual impacta na qualidade de vida e adesão ao tratamento (Lewandowska *et al.*, 2020). Assim, o desenvolvimento de novos medicamentos com maior seletividade torna-se vital.

O índice de seletividade (IS) é um parâmetro farmacológico que auxilia no entendimento sobre a capacidade de uma substância em agir especificamente sobre células alvo, ao comparar os valores de CI_{50} . Se o valor de IS for maior que 1 significa maior seletividade em células cancerígenas, enquanto que abaixo de 1 representa maior toxicidade em células sadias (Lica *et al.*, 2021).

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que, após 72 h de incubação, o EEP-Av apresentou maior seletividade ($IS > 1$) em células tumorais HCT 116 (5,0), seguida por HT-29 (4,4) e LoVo (1,65), indicando uma menor toxicidade relativa em células saudáveis de queratinócitos humanos (HaCaT). Ainda em HCT 116, o extrato apresentou o valor mais elevado de IS em 48 h (5,84), em comparação com o encontrado no período máximo de tratamento. Esse achado contribui na justificativa do uso desse tempo e de sua CI_{50} para os experimentos posteriores.

Em comparação, no tempo de 48 h de tratamento, a droga padrão doxorrubicina (DXR) apresentou um IS abaixo de 1 (0,14), indicando que foi mais citotóxico em células sadias HaCaT do que em células cancerígenas. A doxorrubicina é frequentemente empregada para pesquisas laboratoriais *in vitro* como controle positivo, incluindo em investigações relacionadas ao câncer colorretal. Isso se deve às suas propriedades anticancerígenas bem

estabelecidas e documentadas, com ampla participação em vias de sinalizações importantes para o estudo do câncer (Duarte *et al.*, 2022; Lei *et al.*, 2023).

A DXR é um agente antineoplásico da classe das antraciclinas, indutor de danos no DNA e inibidor de enzimas topoisomerases II. É utilizada no tratamento de carcinomas, sarcomas e cânceres hematológicos, e apresenta inúmeros efeitos adversos como a cardiotoxicidade (Kciuk *et al.*, 2023). A toxicidade de drogas de ampla utilização clínica, como a doxorrubicina e o 5-fluorouracil, é uma propriedade inerente dos agentes citotóxicos (Van Den Boogaard; Komninos; Vermeij, 2022; Zeien *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a avaliação de novos compostos com potencial antitumoral torna-se essencial, especialmente no que tange à sua influência sobre a proliferação celular. Esse processo, que reflete o crescimento celular, é caracterizado pela habilidade das células em se multiplicar. Esse foi outro efeito avaliado do EEP-Av por meio do ensaio de clonogenicidade, que mede a capacidade de uma única célula em se proliferar e formar uma colônia (acima de 50 células) após exposição a drogas, considerando possíveis danos reversíveis e o crescimento de células resistentes ao tratamento (Adan; Kiraz; Baran, 2016; Bravo-San Pedro, *et al.*, 2021).

Observou-se que, após 48 h de exposição e uma semana de crescimento, os grupos com a Cl_{50} (14 $\mu\text{g/mL}$), e a metade desse valor (7 $\mu\text{g/mL}$), do EEP-Av reduziram significativamente a formação de colônias de HCT 116, indicando, portanto, um efeito antiproliferativo do extrato. Resultados similares também foram encontrados com o extrato das partes aéreas de *Annona muricata*, que reduziu a formação de colônias de maneira dependente de concentração em células de câncer de pele UW-BCC1 (carcinoma basocelular) e A431 (carcinoma epidermóide) (Chamcheu *et al.*, 2018).

Além da inibição da proliferação celular, outros mecanismos antitumorais podem ser ativados por produtos naturais, incluindo a apoptose e o estresse oxidativo (Ali Abdalla *et al.*, 2022). Dessa forma, o tipo de morte celular foi o primeiro mecanismo avaliado do EEP-Av, por meio da marcação de células com os fluoróforos laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP), os quais diferenciam células viáveis daquelas em apoptose inicial ou tardia, e em necrose, com base na cor de fluorescência emitida (Gao *et al.*, 2020). Esse ensaio permite, de modo geral, a visualização da morfologia das células expostas ao

EEP-Av, observadas por meio de microscopia confocal de varredura a *laser* (Renvoize *et al.*, 1998).

A partir do estudo de morte celular com LA/IP, verificou-se que, após 48 h, o tratamento com a CI_{50} (14 $\mu\text{g/mL}$) do EEP-Av levou a um aumento significativo no percentual de células em apoptose tardia, enquanto a metade dessa concentração (7 $\mu\text{g/mL}$) aumentou o percentual de células em apoptose inicial. Estes resultados foram semelhantes àqueles vistos com o controle positivo DXR. Porém, foi constatado que a DXR induziu necrose significativa, o que não ocorreu no tratamento com o extrato.

Além disso, foram identificadas características morfológicas clássicas de apoptose em células tratadas com o extrato e a DXR, como a formação de *blebs* (ou bolhas) de membrana, a fragmentação do material genético e condensação de cromatina (Westman; Grinstein; Marques, 2020; Das *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2023).

Na literatura científica não é encontrado estudos que tenham proposto o mecanismo antitumoral de extratos de *A. vepretorum*. Em contrapartida, Bomfim e colaboradores (2016) relataram que o óleo essencial obtido das folhas de *A. vepretorum* induziu apoptose em células B16-F10 (melanoma murino). Em adição, o efeito pró-apoptótico foi descrito em derivados vegetais de outras espécies do gênero, como no extrato etanólico das folhas de *A. cherimola* em células MonoMAC-1 (leucemia mielomonocítica crônica) (Ammoury *et al.*, 2019); e na partição hexânica do extrato bruto de *A. crassiflora* Mart. em células SiHa (câncer cervical), que ativou a via intrínseca da apoptose (Silva *et al.*, 2019).

Em suma, a apoptose é um tipo de morte celular rigorosamente controlada que mantém a homeostase, mas a sua desregulação pode ocasionar o desenvolvimento do câncer, entre outras doenças. Os agentes quimioterápicos, incluindo os produtos naturais, estimulam esse processo vantajosamente para erradicar células cancerígenas, uma vez que esse processo é suprimido nessas células (Carneiro; El-Deiry, 2020; Das *et al.*, 2021). Entre os principais eventos morfológicos característicos de apoptose estão os danos no material genético, como a condensação de cromatina (picnose) e fragmentação do núcleo (cariorrexe) (Park *et al.*, 2023).

Considerando isso, para confirmar as alterações nucleares envolvidas com a apoptose, foi utilizado o corante intercalador de DNA Hoechst 34580 em

células HCT 116 tratadas com o EEP-Av e analisadas por microscopia confocal. Constatou-se um aumento significativo da fluorescência nos grupos de tratamento em relação ao controle (não tratado), confirmando a presença dos eventos danosos no DNA envolvidos com a morte celular, comuns em drogas antitumorais.

Aditivamente, a mitocôndria é a principal organela geradora de energia das células, abrigando moléculas como o citocromo C e fatores apoptogênicos que, após a sua liberação, propagam vias de morte celular como a apoptose. Essa liberação ocorre majoritariamente pela ativação da via intrínseca da apoptose, estimulada por danos no DNA e estresse metabólico. O impacto dessa ativação é refletido no evento irreversível de formação de poros na bicamada lipídica dessa organela, que leva à perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), a partir da oligomerização das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK, resultando na permeabilização da membrana externa mitocondrial (PMEM) e na consequente liberação dos segundos mensageiros (Ježek; Cooper; Strich, 2021; Yuan; Ofengeim, 2024).

Para realizar uma análise mais aprofundada do efeito indutivo de apoptose pelo EEP-Av, buscou-se avaliar a possível modulação no potencial de membrana mitocondrial. Esse potencial é um indicador do estado da função, caracterizado por diferença de potencial elétrico gerado pela cadeia respiratória entre as membranas dessa organela. Se o $\Delta\Psi_m$ está elevado, é indicativo de mitocôndrias saudáveis. Porém se esse indicador cai, é resultado de disfunção mitocondrial como resposta a danos e estresse. Essas alterações são constantemente vistas em casos de estresse oxidativo (Ježek; Cooper; Strich, 2021; Morse *et al.*, 2024).

Para essa investigação foi utilizado o corante catiônico fluorescente 5,5',6,6'-tetraquilbenzimidazolilcarbocianina iodeto (JC-1), uma sonda lipofílica que se acumula dentro das mitocôndrias formando agregados (fluorescência vermelha) quando o $\Delta\Psi_m$ está elevado, indicando células saudáveis. Em contraste, em células com $\Delta\Psi_m$ baixo o JC-1 permanece na forma monomérica (fluorescência verde) (Smiley *et al.*, 1991).

A partir dos dados obtidos por este estudo, a razão entre as fluorescências vermelha/verde indicou que o tratamento com o EEP-Av desviou a razão para o verde de JC-1, diminuindo-a, de forma semelhante ao controle positivo CCCP

(cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona), um indutor de perda do $\Delta\Psi_m$. Pode-se inferir que o extrato diminuiu o potencial de membrana mitocondrial em células de câncer colorretal HCT 116, indicando participação na via intrínseca da apoptose.

Dando continuidade à elucidação do mecanismo antineoplásico, analisou-se a atuação do extrato no estado redox das células HCT 116. Fisiologicamente, a maquinaria metabólica das mitocôndrias produz as espécies reativas de oxigênio (ERO) que, em níveis basais, contribuem para sinalização intra e extracelular relacionadas com a proliferação, diferenciação e morte celular (Manoharan *et al.*, 2024). Estes são regulados por meio de um sistema antioxidante que impede o acúmulo exacerbado, colaborando para o equilíbrio redox (Jelic *et al.*, 2021).

O aumento excessivo na produção desses radicais livres, que é associado a disfunção mitocondrial, desregula esse equilíbrio ocasionando o estresse oxidativo que, diante de vários papéis, participam da tumorigênese (Hayes; DinkovaKostova, 2020). Na função promotora de tumor, ativam vias de sobrevivência e proliferação de células mutadas, auxiliam na progressão metastática e causam danos no DNA, promovendo novas mutações e instabilidade genômica (Hernansanz-Agustín; Enríquez, 2021).

No câncer colorretal, a depleção de TP53 e mutação no oncogene KRAS são cooperativas para a formação da massa tumoral, remodelando o metabolismo energético que aumenta de forma direta e indireta os níveis de ERO (Kealey *et al.*, 2022). As células cancerígenas toleram essa elevação aumentando os elementos antioxidantes. Essa adaptação redox causa quimiorresistência até em medicamentos para o tratamento do CCR que induzem estresse oxidativo, como o 5-FU e oxaliplatina. Isso acontece associado a outros mecanismos como regulação de transportadores de efluxo de drogas, instabilidade genômica e inibição da apoptose, estimulados por concentrações aberrantes de ERO (Basak; Uddin; Hancock, 2020).

Por outro lado, a manipulação do estado redox constitui uma abordagem mecanística seletiva para induzir morte celular, devido a vulnerabilidade das células tumorais que carregam uma menor capacidade antioxidante, metabolismo alterado e deficiência no sistema de reparo em comparação a células saudáveis (Basak; Uddin; Hancock, 2020). A produção excessiva desses

radicais livres por parte de drogas naturais e sintéticas pró-oxidantes, supera o limiar que as células cancerígenas suportam chegando a níveis tóxicos capazes de induzir a apoptose, superando a resistência aos medicamentos (Ali *et al.*, 2024). Essa estratégia também é usada em radioterapia ionizante e na imunoterapia (Zheng *et al.*, 2023).

Dessa forma, a investigação da citotoxicidade do EEP-Av em células HCT 116 por possível modulação do estresse oxidativo foi avaliada por meio do ensaio do MTT, comparando a viabilidade celular de grupos com tratamento prévio com a molécula antioxidante N-acetilcisteína (NAC), cuja finalidade é prevenir o estresse oxidativo, e aqueles sem o tratamento com NAC. Os resultados obtidos mostraram que, após 48 h, os grupos de EEP-Av pré-tratados com NAC obtiveram prevenção significativa da morte celular quando comparados com os grupos sem o tratamento prévio, demonstrando assim que o extrato altera o estado redox das células ao exercer efeito pró-oxidante.

A estratégia de efeito pró-apoptótico mediado por indução de estresse oxidativo também foi visto no extrato acetato de etila das folhas de *A. muricata*, o qual elevou a formação de ERO, diminuiu o potencial de membrana mitocondrial, liberou o citocromo c e ativou enzimas caspases executoras da apoptose em células HCT 116 e HT-29 (Moghadamtousi *et al.*, 2014).

Considerando os resultados descritos neste trabalho, pode-se inferir que o extrato éter de petróleo de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) induz significativa atividade anticâncer em linhagem de câncer colorretal humano HCT 116, com mecanismos de ação envolvendo a indução de apoptose e estresse oxidativo, caracterizando um efeito pró-oxidante. Dessa forma, este trabalho evidencia um novo derivado vegetal com potencial farmacológico, o que subsidia a realização de novos estudos que busquem o aprofundamento mecanístico, com o intuito de contribuir na descoberta de novos fármacos para o tratamento do câncer.

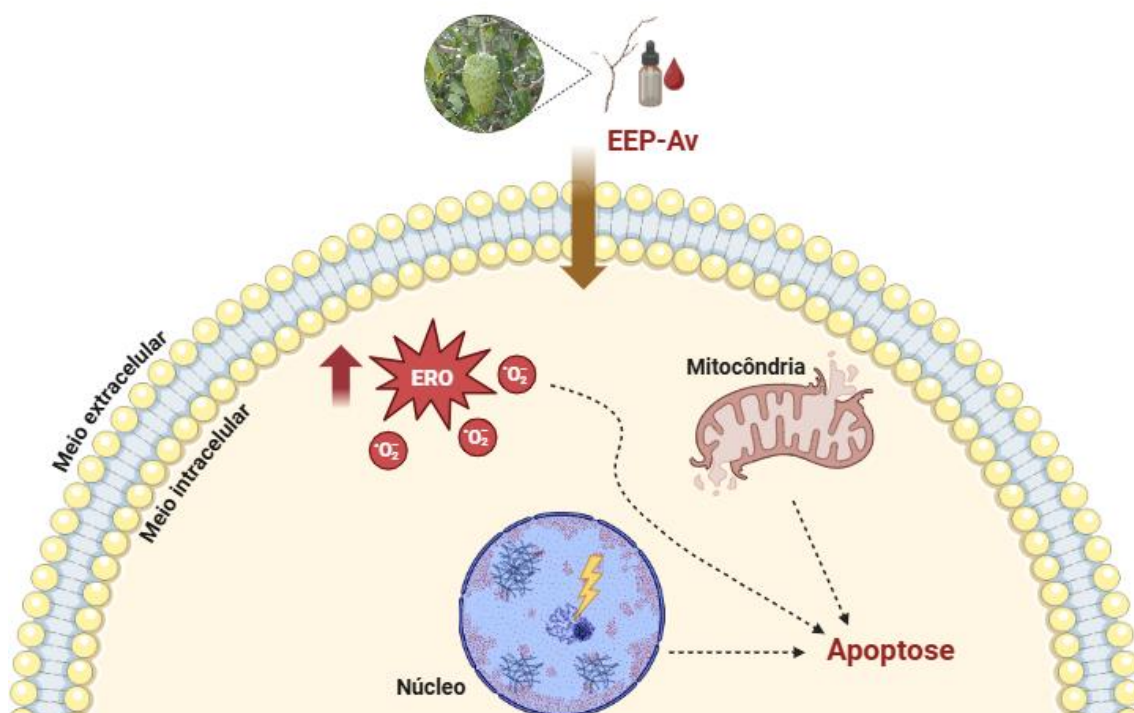
CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o extrato éter de petróleo das cascas do caule de *Annona vepretorum* Mart. (EEP-Av) induziu efeito citotóxico proeminente em três linhagens de células de câncer colorretal humano: HCT 116 (adenocarcinoma colorretal), HT-29 (adenocarcinoma colorretal) e LoVo (adenocarcinoma metastático colorretal), com atividade mais expressiva e dependente de tempo e de concentração em HCT 116. Foi encontrado maior seletividade citotóxica nessas células em comparação com a linhagem não tumoral HaCaT (queratinócitos humanos saudáveis), no qual apresentou menor citotoxicidade, assim como também especificidade celular superior ao controle positivo doxorrubicina.

Adicionalmente, na linhagem HCT 116, o EEP-Av induziu efeito antiproliferativo e atividade antitumoral *in vitro*, possivelmente mediado por modulação da via intrínseca da apoptose, após a perda do potencial de membrana mitocondrial, promoção de estresse oxidativo e danos no material genético. Contudo, são esperados novos estudos que aprofundem o mecanismo antitumoral do extrato e de seus constituintes majoritários.

Figura 22. Mecanismo de ação do extrato éter de petróleo das cascas do caule de *Annona vepretorum* Mart. (EEP-Av) em células HCT 116



Legenda: O EEP-Av induz apoptose em células de adenocarcinoma colorretal humano (HCT 116) dependente do aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), promovendo perda do potencial na membrana mitocondrial e danos no material genético.

Fonte: Elaborado pelo autor.

8 PERSPECTIVAS

Diante da confirmação experimental da atividade citotóxica e antitumoral do extrato éter de petróleo de *Annona vepretorum* Mart., o presente trabalho sugere continuidade à investigação dos mecanismos de ação, visando à melhor caracterização e documentação do potencial farmacológico da planta.

Para isso, é proposto a investigação sobre a regulação do ciclo celular, uma análise mais aprofundada da indução de morte celular por apoptose, incluindo a avaliação da modulação de caspases, e o estudo da participação de vias de proliferação celular relacionadas a proteínas quinases ativadas por mitógenos (ERK, JNK e p38). Por fim, surge como perspectiva a investigação do efeito antitumoral do EEP-Av em modelos *in vivo* de câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDUL WAHAB, Siti Mariam *et al.* Exploring the leaves of *Annona muricata* L. as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 661, 2018.

ABDULLAH, Aland Salih *et al.* Benign Tumor Publication in One Year (2022): A Cross-Sectional Study. **Barw Medical Journal**, 2023.

ABOELELLA, Nada S. *et al.* Oxidative stress in the tumor microenvironment and its relevance to cancer immunotherapy. **Cancers**, v. 13, n. 5, p. 986, 2021.

ADACHI-FERNANDEZ, Emi *et al.* Abstract A013: Role of EGFR in KRAS-mediated resistances in colorectal cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 21, n. 5_Supplement, p. A013-A013, 2023.

ADAN, Aysun; KIRAZ, Yagmur; BARAN, Yusuf. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.

AHMAD, Anas; AHSAN, Haseeb. Ras-mediated activation of NF- κ B and DNA damage response in carcinogenesis. **Cancer Investigation**, v. 38, n. 4, p. 185-208, 2020.

AL KAZMAN, Bassam SM; HARNETT, Joanna E.; HANRAHAN, Jane R. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of annonaceae. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3462, 2022.

AL-BEDEARY, S.; GETTA, H. A.; AL-SHARAFI, D. The hallmarks of cancer and their therapeutic targeting in current use and clinical trials. **Iraqi Journal of Hematology**. v. 9, n. 1, p. 1, 2020.

ALI ABDALLA, Yasir Osman *et al.* Natural products for cancer therapy: a review of their mechanism of actions and toxicity in the past decade. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2022, n. 1, p. 5794350, 2022.

ALI, Taufeeque *et al.* Generation of hydrogen peroxide in cancer cells: advancing therapeutic approaches for cancer treatment. **Cancers**, v. 16, n. 12, p. 2171, 2024.

ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva *et al.* Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart.(Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 258-264, 2014.

AMMOURY, Carl *et al.* The pro-apoptotic effect of a Terpene-rich *Annona cherimola* leaf extract on leukemic cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, p. 1-10, 2019.

ARAÚJO, Camila de S. *et al.* Chemical constituents isolated from extracts of *Annona vepretorum* Mart.(Annonaceae) leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, p. 439-444, 2017.

ARAÚJO, Camila *et al.* Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from leaves of *Annona vepretorum* Mart.(Annonaceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 43, p. 615, 2015.

ARAÚJO, Camila de Souza *et al.* New ent-kaurene-type nor-diterpene and other compounds isolated from *Annona vepretorum* Mart.(Annonaceae). **Natural Product Research**, v. 37, n. 9, p. 1565-1572, 2023.

ARENDS, Mark J. Pathways of colorectal carcinogenesis. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 21, n. 2, p. 97-102, 2013.

ARFIN, Saniya *et al.* Oxidative stress in cancer cell metabolism. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 642, 2021.

BAKRIM, Saad *et al.* Health benefits and pharmacological properties of stigmasterol. **Antioxidants**, v. 11, n. 10, p. 1912, 2022.

BALAJI, Swapnaa *et al.* Alternative approaches to overcome chemoresistance to apoptosis in cancer. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 126, p. 91-122, 2021.

BAO, Xingxun *et al.* Molecular mechanism of β -sitosterol and its derivatives in tumor progression. **Frontiers in oncology**, v. 12, p. 926975, 2022.

BARDELČÍKOVÁ, Annamária; ŠOLTYS, Jindřich; MOJŽIŠ, Ján. Oxidative stress, inflammation and colorectal cancer: an overview. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 901, 2023.

BASAK, Debasish; UDDIN, Mohammad Nasir; HANCOCK, Jake. The role of oxidative stress and its counteractive utility in colorectal cancer (CRC). **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3336, 2020.

BOUTRY, Justine *et al.* The evolution and ecology of benign tumors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1877, n. 1, p. 188643, 2022.

BRAGA, Fernão Castro. Paving new roads towards biodiversity-based drug development in Brazil: Lessons from the past and future perspectives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 1-14, 2021.

BRAVO-SAN PEDRO, Jose Manuel *et al.* Clonogenic assays to detect cell fate in mitotic catastrophe. **Cell Cycle Checkpoints: Methods and Protocols**, p. 227-239, 2021.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.

CAESAR, Lindsay K.; CECH, Nadja B. Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1+ 1 does not equal 2. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 6, p. 869-888, 2019.

CALIXTO, João B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. Suppl 3, p. e20190105, 2019.

CANO-MARTÍNEZ, Agustina; RUBIO-RUIZ, María Esther; GUARNER-LANS, Verónica. Homeostasis and evolution in relation to regeneration and repair. **The Journal of Physiology**, v. 602, n. 11, p. 2627-2648, 2024.

CARNEIRO, Benedito A.; EL-DEIRY, Wafik S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 395-417, 2020.

CHAMCHEU, Jean Christopher *et al.* Graviola (*Annona muricata*) exerts anti-proliferative, anti-clonogenic and pro-apoptotic effects in human non-melanoma skin cancer UW-BCC1 and A431 cells in vitro: involvement of hedgehog signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1791, 2018.

CHANU, M.; SINGH, A. Different types of cancer treatment, its advancement, benefits, and side effects. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, [s.l.], 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.30574/wjarr.2024.24.1.2994>. Acesso em: 24 mar. 2025.

CHATROU, Lars W. *et al.* A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.

CHAUDHRY, Gul-e-Saba *et al.* Cancer and apoptosis. In: **Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2022. p. 191-210.

CHEN, Kabytto *et al.* Pathological features and prognostication in colorectal cancer. **Current Oncology**, v. 28, n. 6, p. 5356-5383, 2021.

CHOI, Yonghoon; KIM, Nayoung. Sex difference of colon adenoma pathway and colorectal carcinogenesis. **The World Journal of Men's Health**, v. 42, n. 2, p. 256, 2023.

COMPTON, Carolyn; COMPTON, Carolyn. Cancer initiation, promotion, and progression and the acquisition of key behavioral traits. **Springer International Publishing**, 2020. p. 25-48.

COSTA, Emmanoel Vilaca *et al.* Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 2, p. 1934578X1200700240, 2012.

COSTA, Renyer A. *et al.* Quantum chemical studies, vibrational analysis, molecular dynamics and docking calculations of some ent-kaurane diterpenes from *Annona vepretorum*: a theoretical approach to promising anti-tumor molecules. **Structural Chemistry**, v. 31, p. 1223-1243, 2020.

CURRAIS, Pedro; ROSA, Isadora; CLARO, Isabel. Colorectal cancer carcinogenesis: From bench to bedside. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 14, n. 3, p. 654, 2022.

DAS, Shreya *et al.* Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer. **Apoptosis**, p. 1-22, 2021.

DATASUS. Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS)/Plataforma DATASUS-NET. Disponível em: <tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def> Acesso em janeiro de 2025.

DAVIES, Helen *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949-954, 2002.

OLIVEIRA SANTOS, Marcell *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023.

DE PALMA, Fatima Domenica Elisa *et al.* The molecular hallmarks of the serrated pathway in colorectal cancer. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 1017, 2019.

DE VISSER, Karin E.; JOYCE, Johanna A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. **Cancer Cell**, v. 41, n. 3, p. 374-403, 2023.

DEBELA, Dejene Tolossa *et al.* New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. **SAGE Open Medicine**, v. 9, 2021.

DEL PINO HERRERA, Adriana; FERRALL-FAIRBANKS, Meghan C. A war on many fronts: cross disciplinary approaches for novel cancer treatment strategies. **Frontiers in Genetics**, v. 15, p. 1383676, 2024.

DINIZ, Tamara Coimbra *et al.* Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1074-1087, 2019.

DINIZ, Tâmara Coimbra *et al.* Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, p. 2729-2735, 2013.

DUARTE, Sâmia Sousa *et al.* Apoptotic and antioxidant effects in HCT-116 colorectal carcinoma cells by a spiro-acridine compound, AMTAC-06. **Pharmacological Reports**, v. 74, n. 3, p. 545-554, 2022.

DUTRA, Livia M. *et al.* ent-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 15, p. 3315-3320, 2014a.

DUTRA, Livia Macedo. Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). 2014. 171 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014b.

Disponível em: https://sucupira-legado.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=1384493. Acesso em: 28 abr. 2025.

EADS, Cindy A. *et al.* CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. **Cancer Research**, v. 59, n. 10, p. 2302-2306, 1999.

EL NACHEF, Laura *et al.* When DNA mutations interplay with cellular proliferation: a narrative history of theories of carcinogenesis. **Cancers**, v. 16, n. 11, p. 2104, 2024.

FEARON, Eric R. Cancer progression. **Current biology**, v. 9, n. 23, p. R873-R875, 1999.

FEARON, Eric R.; VOGELSTEIN, Bert. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.

FERREIRA, Rafael Carlos *et al.* The essential oil from *Conyza bonariensis* (L.) cronquist (asteraceae) exerts an in vitro antimelanoma effect by inducing apoptosis and modulating the MAPKs, NF- κ B, and PKB/AKT signaling pathways. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 11, p. 1553, 2023.

FIDYT, Klaudyna *et al.* β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

- FISHBEIN, Anna *et al.* Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation?. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 218, p. 107670, 2021.
- FRIEDENREICH, Christine M.; RYDER-BURBIDGE, Charlotte; MCNEIL, Jessica. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. **Molecular Oncology**, v. 15, n. 3, p. 790-800, 2021.
- FRITZ, Cassandra DL *et al.* Red-flag signs and symptoms for earlier diagnosis of early-onset colorectal cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 115, n. 8, p. 909-916, 2023.
- FUCHS, Heiko *et al.* Breaking a Dogma: High-Throughput Live-Cell Imaging in Real-Time with Hoechst 34580. **Advanced Healthcare Materials**, v. 12, n. 20, p. 2300230, 2023.
- FUNK, Cornelius Maximilian; MUSA, Julian. Proliferation assessment by trypan blue exclusion in ewing sarcoma. In: **Ewing Sarcoma: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 151-158.
- GAO, W. *et al.* A double staining method using calcofluor white and acridine orange to differentiate life stages of Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) on hepatopancreatic sections. **Aquaculture**, v. 528, p. 735628, 2020.
- GHASEMI, Mahshid *et al.* The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.
- GONÇALVES, Juan Carlos Ramos; SOBRAL, Marianna Vieira (orgs.). Cultivo de células: da teoria à bancada. João Pessoa: **Editora UFPB**, 2020. 166 p. : il. ISBN 978-65-5942-027-8.
- HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HASS, Ralf; VON DER OHE, Juliane; UNGEFROREN, Hendrik. Impact of the tumor microenvironment on tumor heterogeneity and consequences for cancer cell plasticity and stemness. **Cancers**, v. 12, n. 12, p. 3716, 2020.

HAWKINS, Nicholas *et al.* CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. **Gastroenterology**, v. 122, n. 5, p. 1376-1387, 2002.

HAYES, John D.; DINKOVA-KOSTOVA, Albena T.; TEW, Kenneth D. Oxidative stress in cancer. **Cancer Cell**, v. 38, n. 2, p. 167-197, 2020.

HERNANSANZ-AGUSTÍN, Pablo; ENRÍQUEZ, José Antonio. Generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 415, 2021.

HILL, Brian T. Etiology of cancer. **Clinical Ophthalmic Oncology: Basic Principles**, p. 11-17, 2019.

HOLTEDAHL, Knut *et al.* Symptoms and signs of colorectal cancer, with differences between proximal and distal colon cancer: a prospective cohort study of diagnostic accuracy in primary care. **BMC Family Practice**, v. 22, p. 1-13, 2021.

HOSSAIN, M. S. *et al.* Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. **Cancers**, 14 (7), 1732 [em linha]. 2022.

HUA, Hongmei *et al.* Risk factors for early-onset colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1132306, 2023.

HUANG, Min; LU, Jin-Jian; DING, Jian. Natural products in cancer therapy: Past, present and future. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, n. 1, p. 5-13, 2021.

HUANG, Xuan-mei *et al.* Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 117, p. 109142, 2019.

ISLAM, Md Rezaul *et al.* Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. **Chemico-Biological Interactions**, v. 368, p. 110170, 2022.

JACKMAN, Julia M. *et al.* Updates in global oncology: Advancements and future directions. **Journal of Surgical Oncology**, v. 129, n. 7, p. 1374-1383, 2024.

JELIC, Marija Dragan *et al.* Oxidative stress and its role in cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 17, n. 1, p. 22-28, 2021.

JESSURUN, J. Helicobacter pylori: an evolutionary perspective. **Histopathology**, v. 78, n. 1, p. 39-47, 2021.

JEŽEK, Jan; COOPER, Katrina F.; STRICH, Randy. The impact of mitochondrial fission-stimulated ROS production on pro-apoptotic chemotherapy. **Biology**, v. 10, n. 1, p. 33, 2021.

KCIUK, Mateusz *et al.* Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. **Cells**, v. 12, n. 4, p. 659, 2023.

KEALEY, James *et al.* Effect of TP53 deficiency and KRAS signaling on the bioenergetics of colon cancer cells in response to different substrates: A single cell study. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 893677, 2022.

KHIARI, Houyem *et al.* Estimated Cancer Incidence in Northern Tunisia in 2023: Northern Tunisia Cancer Registry. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 12, p. 4359-4369, 2024.

KLAUNIG, James E. Oxidative stress and cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 40, p. 4771-4778, 2018.

KOI, Minoru *et al.* Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. **Cancer Research**, v. 54, n. 16, p. 4308-4312, 1994.

- KONTOMANOLIS, Emmanuel N. *et al.* Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. **Anticancer research**, v. 40, n. 11, p. 6009-6015, 2020.
- KRASTEVA, Natalia; GEORGIEVA, Milena. Promising therapeutic strategies for colorectal cancer treatment based on nanomaterials. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 6, p. 1213, 2022.
- LANGEVIN, Scott M.; KELSEY, Karl T. Mechanisms of environmental and occupational carcinogenesis. **Occupational Cancers**, p. 39-55, 2020.
- LEI, Yongdong *et al.* Natural product procyanidin B1 as an antitumor drug for effective therapy of colon cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 26, n. 5, p. 506, 2023.
- LEWANDOWSKA, Anna *et al.* Quality of life of cancer patients treated with chemotherapy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 19, p. 6938, 2020.
- LEWANDOWSKA, Anna *et al.* Risk factors for the diagnosis of colorectal cancer. **Cancer Control**, v. 29, p. 10732748211056692, 2022.
- LI, Lan-Ya *et al.* DNA repair pathways in cancer therapy and resistance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 629266, 2021.
- LI, Qing *et al.* Signaling pathways involved in colorectal cancer: Pathogenesis and targeted therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 266, 2024.
- LI, Yanqun *et al.* The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020.
- LICA, Jan Jakub *et al.* Effective drug concentration and selectivity depends on fraction of primitive cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4931, 2021.
- LIEBL, Magdalena C.; HOFMANN, Thomas G. The role of p53 signaling in colorectal cancer. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2125, 2021.

LIU, Jia Jenny. Dendrimer-enhanced (DEP) SN38 (DEP irinotecan) in patients with advanced solid tumors: a Phase 1/2 trial. **Journal of Clinical Oncology**. 2024.

LOPEZ, L. R.; BLEICH, R. M.; ARTHUR, J. C. Microbiota effects on carcinogenesis: initiation, promotion and progression. **Annual Review of Medicine**., v. 72, 2020.

MAHMOUD, Najjia N. Colorectal cancer: preoperative evaluation and staging. **Surgical Oncology Clinics**, v. 31, n. 2, p. 127-141, 2022.

MANN, B. *et al.* Target genes of β -catenin–T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 4, p. 1603-1608, 1999.

MANOHARAN, Renuka Ramalingam *et al.* ROS signaling in innate immunity via oxidative protein modifications. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1359600, 2024.

MARRELLI, Mariangela. Medicinal plants. **Plants**, v. 10, n. 7, p. 1355, 2021.

MEHLEN, Patrick; FEARON, Eric R. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 16, p. 3420-3428, 2004.

MEIRA, Cássio S. *et al.* Chemical composition of essential oils from *Annona vepretorum* Mart. and *Annona squamosa* L.(Annonaceae) leaves and their antimalarial and trypanocidal activities. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 2, p. 160-168, 2015.

MENEZES, Renata PB *et al.* Secondary metabolites extracted from Annonaceae and chemotaxonomy study of terpenoids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 2061-2070, 2021.

MOGHADAMTOUSI, Soheil Zorofchian *et al.* *Annona muricata* leaves induce G1 cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 277-289, 2014.

MORGAN, Eileen *et al.* Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. **Gut**, v. 72, n. 2, p. 338-344, 2023.

MORSE, Paul T. *et al.* Phosphorylations and acetylations of cytochrome c control mitochondrial respiration, mitochondrial membrane potential, energy, ROS, and apoptosis. **Cells**, v. 13, n. 6, p. 493, 2024.

NAZ, Tehnia *et al.* Impact of bevacizumab on clinical outcomes and its comparison with standard chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Pharmaceutical Policy and Practice**, v. 17, n. 1, p. 2354300, 2024.

NEOPHYTOU, Christiana M. *et al.* Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4363, 2021.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NGUYEN, Long H.; GOEL, Ajay; CHUNG, Daniel C. Pathways of colorectal carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 158, n. 2, p. 291-302, 2020.

OLIVEIRA, Paula A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 593-616, 2007.

PARK, Wonyoung *et al.* Diversity and complexity of cell death: a historical review. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 55, n. 8, p. 1573-1594, 2023.

PEDRE, Brandán *et al.* The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H₂S and sulfane sulfur species. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 228, p. 107916, 2021.

PATEL, Aisha. Benign vs malignant tumors. **JAMA oncology**, v. 6, n. 9, p. 1488- 1488, 2020.

PETRICK, Jessica L. *et al.* Racial disparities and sex differences in early-and late-onset colorectal cancer incidence, 2001–2018. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 734998, 2021.

- PUZZONO, Marta *et al.* The role of diet and lifestyle in early-onset colorectal cancer: a systematic review. **Cancers**, v. 13, n. 23, p. 5933, 2021.
- RANDRIAN, Violaine; EVRARD, Camille; TOUGERON, David. Microsatellite instability in colorectal cancers: carcinogenesis, neo-antigens, immuno-resistance and emerging therapies. **Cancers**, v. 13, n. 12, p. 3063, 2021.
- RAO, Pooja Prakash *et al.* Evaluation of the merit of ethanolic extract of *Annona reticulata* as an anti-cancer agent in human colon cancer cell lines (HCT-116). **F1000Research**, v. 12, p. 1571, 2024.
- RASTIN, Farangis *et al.* Immunotherapy for colorectal cancer: Rational strategies and novel therapeutic progress. **International Immunopharmacology**, v. 126, p. 111055, 2024.
- RAVI, Swapna *et al.* An update to hallmarks of cancer. **Cureus**, v. 14, n. 5, 2022.
- RENVOIZE, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BREARD, J. Apoptosis: identification of dying cells. **Cell biology and Toxicology**, v. 14, n. 2, p. 111-120, 1998.
- RUFFINELLI, Jose Carlos *et al.* New advances in the clinical management of RAS and BRAF mutant colorectal cancer patients. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 1, p. 65-79, 2021.
- SARMIENTO-SALINAS, Fabiola Lilí *et al.* Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression. **Life Sciences**, v. 284, p. 119942, 2021.
- SAWICKI, Tomasz *et al.* A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2025, 2021.
- SCHAEDLER, Anelise Camila *et al.* Disparidades sociodemográficas no câncer colorretal no Brasil, 1990-2019. **Saúde em Debate**, v. 48, p. e8880, 2024.
- SHAJI, V., *et al.* Retrospective analysis of lung cancer in a tertiary care hospital: unravelling treatment modalities, adverse drug reactions, and secondary

cancer. **International Journal for Multidisciplinary Research**, [s.l.], v. 6, n. 4, 2024.

Shaposhnikov, A., Kit, O., Nepomnyaschaya, E., & Yurieva, E. (2022). Hepatocellular cancer. Current aspects of carcinogenesis. **Clinical And Experimental Morphology**. <https://doi.org/10.31088/cem2022.11.4.5-15>

SHINJI, Seiichi *et al.* Recent advances in the treatment of colorectal cancer: a review. **Journal of Nippon Medical School**, v. 89, n. 3, p. 246-254, 2022.

SIEGEL, Rebecca L.; GIAQUINTO, Angela N.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2024. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 1, p. 12-49, 2024.

SILVA, Juliane C. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Annona vepretorum* Mart.(Annonaceae) in rodents. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 1-10, 2015.

SILVA, Mariana G. *et al.* Phytochemical screening, cytotoxicity and acute toxicity of *Annona vepretorum* Mart (Annonaceae) leaf extracts. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 3, p. 597-604, 2017.

SILVA, Viviane AO *et al.* Hexane partition from *Annona crassiflora* Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines. **Investigational New Drugs**, v. 37, p. 602-615, 2019.

SINGH, Puneet; LIM, Bora. Targeting apoptosis in cancer. **Current Oncology Reports**, v. 24, n. 3, p. 273-284, 2022.

SINGH, Rumani; LETAI, Anthony; SAROSIEK, Kristopher. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 175-193, 2019.

SIQUEIRA FILHO, J. A. Descrição sobre *Annona vepretorum* Mart. 2008. Disponível em:
<<http://www.univasf.edu.br/~hvasf/index.php?page=dados&query=annona>>. Acesso em: 22 jan. 2025.

STEELE, Scott R. *et al.* The impact of age on colorectal cancer incidence, treatment, and outcomes in an equal-access health care system. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 57, n. 3, p. 303-310, 2014.

SUCHARITHA, A. An overview of cancer. **Advances in Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s.l.], 2023.

SUN, Ying *et al.* The influence of cell cycle regulation on chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6923, 2021.

SUREK, Monica *et al.* Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113662, 2021.

SWAIN, Brendan M. *et al.* Complexities of a protonatable substrate in measurements of Hoechst 34580 transport by multidrug transporter LmrP. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 20026, 2020.

TAIEB, Julien *et al.* Prognosis of microsatellite instability and/or mismatch repair deficiency stage III colon cancer patients after disease recurrence following adjuvant treatment: results of an ACCENT pooled analysis of seven studies. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 9, p. 1466-1471, 2019.

TALIB, Wamidh H. *et al.* Targeting drug chemo-resistance in cancer using natural products. **Biomedicines**, v. 9, n. 10, p. 1353, 2021.

TAMURA, Shuta *et al.* p53-armed oncolytic adenovirus induces autophagy and apoptosis in KRAS and BRAF-mutant colorectal cancer cells. **PloS One**, v. 18, n. 11, p. e0294491, 2023.

TELES, Maria Nazaré *et al.* Alkaloids from leaves of *Annona salzmannii* and *Annona vepretorum* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 61, p. 465- 469, 2015.

TWAIJ, Baan Munim; HASAN, Md Nazmul. Bioactive secondary metabolites from plant sources: Types, synthesis, and their therapeutic uses. **International Journal of Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 4-14, 2022.

UDE, Arinzechukwu *et al.* Trypan Blue Exclusion Assay, Neutral Red, Acridine Orange and Propidium Iodide. In: Cytotoxicity. **IntechOpen**, 2022.

VAN DEN BOOGAARD, Winnie MC; KOMNINOS, Daphne SJ; VERMEIJ, Wilbert P. Chemotherapy side-effects: Not all DNA damage is equal. **Cancers**, v. 14, n. 3, p. 627, 2022.

VENDERBOSCH, Sabine *et al.* Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 20, p. 5322-5330, 2014.

VITALE, Ilio *et al.* Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the NCCD 2023. **Cell Death & Differentiation**, v. 30, n. 5, p. 1097-1154, 2023.

VODANOVICH, Domagoj Ante; CHOONG, Peter FM. Soft-tissue sarcomas. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 52, p. 35-44, 2018.

VOSS, Anne K.; STRASSER, Andreas. The essentials of developmental apoptosis. **F1000Research**, v. 9, 2020.

VUČETIĆ, Milica *et al.* The central role of amino acids in cancer redox homeostasis: vulnerability points of the cancer redox code. **Frontiers in Oncology**, v. 7, p. 319, 2017.

WANG, Xiang *et al.* Targeting KRAS-mutant stomach/colorectal tumors by disrupting the ERK2-p53 complex. **Cell Reports**, v. 42, n. 1, 2023.

WESTMAN, Johannes; GRINSTEIN, Sergio; MARQUES, Pedro Elias. Phagocytosis of necrotic debris at sites of injury and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 3030, 2020.

WILLIAMS, Christopher Kwesi O.; WILLIAMS, Christopher Kwesi O. Risk factors for cancer. **Cancer and AIDS: Part II: Cancer Pathogenesis and Epidemiology**, p. 115-178, 2019.

XIE, Yuan-Hong; CHEN, Ying-Xuan; FANG, Jing-Yuan. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 22, 2020.

YUAN, Junying; OFENGEIM, Dimitry. A guide to cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 25, n. 5, p. 379-395, 2024.

ZEIEN, Justin *et al.* Clinical implications of chemotherapeutic agent organ toxicity on perioperative care. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112503, 2022

ZHANG, Baoyi *et al.* Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. **Redox Report**, v. 27, n. 1, p. 45-52, 2022a.

ZHANG, Wanlu *et al.* Remodeling tumor microenvironment with natural products to overcome drug resistance. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1051998, 2022b.

ZHAO, Wei *et al.* Advances of antitumor drug discovery in traditional Chinese medicine and natural active products by using multi-active components combination. **Medicinal Research Reviews**, v. 43, n. 5, p. 1778-1808, 2023.

ZHENG, Zhuangzhuang *et al.* Mechanisms and applications of radiation-induced oxidative stress in regulating cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1247268, 2023.

ZHU, Jing-Jing *et al.* Antiproliferative and apoptotic effects of campesterol in HCT-116 human colon carcinoma cells are mediated via mitochondrial disruption and inhibition of cell migration. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 35, p. 1285-91, 2016.

ANEXOS

Potential *In Vitro* Antimelanoma Effect of the Essential Oil from *Croton grewoides* Baill

Camyla Caroliny Neves de Andrade,^[a] Ana Luiza de Oliveira Lopes,^[a] Sâmia Sousa Duarte,^[a] Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo,^[a] Paulo Bruno Araujo Loureiro,^[a] Geraldo Moisés Wanderley Amorim,^[a] Adegildo Rolim de Abreu Junior,^[a] Marcelo Sobral da Silva,^[a, b] Josean Fecine Tavares,^[a, b] Sócrates dos Santos Golzio,^[a, b] Juan Carlos Ramos Gonçalves,^{*,[a, b]} and Marianna Vieira Sobral^{*,[a, b]}

Cancer is a group of diseases characterized by uncontrolled cell growth, invasive capacity, and metastatic potential. Despite the continual progress in cancer treatment, high toxicity and resistance to therapy remain recurring challenges. *Croton grewoides* Baill. is a plant from the Brazilian semi-arid region with significant pharmacological potential due to its reported antidiarrheal, antioxidant, and antitumor properties. This study evaluated the antitumor activity of the essential oil from *C. grewoides* leaves (CgEO) by *in vitro* assays. CgEO showed higher

cytotoxicity in human melanoma cells (SK-MEL-28), with a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 70.0 µg/mL after 72 h, but with low toxicity in healthy keratinocytes (HaCaT). Additionally, it was suggested that the antitumor effect of CgEO is associated with the induction of apoptosis, cell cycle alterations, and combined antioxidant action mechanisms. In conclusion, CgEO exhibits antitumor activity with lower toxicity in non-tumor cells.

Introduction

Cancer is a severe disease that originates from the accumulation of numerous mutations in cells, leading to the development of various characteristics that confer ability to survive and proliferate uncontrollably.^[1,2] Considered the second leading cause of death globally, the disease accounts for more than 10 million deaths every year, according to estimates by the World Health Organization (WHO).^[3]

Skin cancers, such as melanoma, arise from the disordered proliferation of melanocytes, becoming one of the most lethal forms of the disease.^[4] Based on recent statistics made by the Global Cancer Observatory, approximately 331,000 new cases of melanoma were reported in 2022, with about 58,000 deaths attributed to this disease.^[5] In Brazil, the situation is concerning due to the tropical climate and high exposure to ultraviolet rays, factors that increase the risk of skin cancer.^[6] In the same year, nearly 2,000 deaths were caused by melanoma-type skin cancer.^[7]

Among the various therapies available for cancer treatment, chemotherapy is the most commonly used, as it aims to induce cytotoxicity in tumor cells.^[8] However, this treatment has limitations, including high systemic toxicity and the potential for tumor cells to develop resistance. These limitations motivate the search for new, more effective, and less toxic therapies.^[9,10]

Approximately 60% of the drugs available for clinical cancer treatment are natural products or their derivatives.^[11] Thus, natural products, especially plant species, have attracted attention as potential sources for new cancer treatments.^[12] In Brazil, which has the world's highest plant biodiversity, with about 20% of all species on the planet, represents a rich source for exploration. However, it is estimated that only 10% of this diversity has been adequately studied.^[13] Therefore, the investigation of natural products, particularly plant derivatives, is a promising area for the development of innovative therapies.^[14]

The genus *Croton*, one of the most studied within the Euphorbiaceae family and belonging to the Crotonoideae subfamily, comprises about 1,300 species. It holds significant importance in Brazilian flora, with approximately 300 species.^[15] Several species of the genus *Croton* are characterized by the production of essential oils, most of which are rich in mono and sesquiterpenes. On the other hand, some species such as *C. zehntneri* and *C. grewoides* are mainly composed of phenylpropanoids.^[16]

The species *Croton grewoides* Baill. is found in all states of the Northeast region of Brazil, particularly in semi-arid regions. It is popularly known as "canelinha," "caatinga de cheiro," or "canelinha-de-cheiro" due to the cinnamon-like scent exuded from its leaves.^[15] Previous studies have demonstrated antidiarrheal activity of the crude ethanolic extract of the aerial parts of *C. grewoides*,^[17] antimicrobial activity of the essential oils from

[a] C. C. N. de Andrade, A. L. de Oliveira Lopes, S. Sousa Duarte, F. d. L. Assunção Araújo de Azevedo, P. B. Araujo Loureiro, G. M. Wanderley Amorim, A. R. de Abreu Junior, M. Sobral da Silva, J. Fecine Tavares, S. d. Santos Golzio, J. C. Ramos Gonçalves, M. Vieira Sobral

Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

[b] M. Sobral da Silva, J. Fecine Tavares, S. d. Santos Golzio, J. C. Ramos Gonçalves, M. Vieira Sobral
Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil
E-mail: juan.goncalves@academico.ufpb.br
mariannavbs@gmail.com



Synthesis of Polyglycerol/PolyCaprolactone Nanocopolymers as Innovative Architectures for Drug Delivery

Diego Botelho Campelo Leite^{1,2} · Edmilson Miranda de Moura¹ · Edvani Curti Muniz¹ · Edson Cavalcanti da Silva Filho¹ · Anderson Nogueira Mendes³ · Lívia Alves Filgueiras³ · Adegildo Rolim de Abreu Júnior⁴ · Juan Carlos Ramos Gonçalves⁴ · Karinne Kelly Gadelha Marques⁴ · Marianna Vieira Sobral⁴ · André Luis Menezes Carvalho⁵ · Carla Verônica Rodarte de Moura¹

Accepted: 20 July 2024 / Published online: 12 August 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

Nanoparticles represent an innovative class of drug delivery systems that have gained increasing interest in nanotechnology applied to medicine. This study focused on the development of two Polyglycerol/PolyCaprolactone Nanocopolymers to be able to carry pharmaceuticals. The copolymers were characterized by FTIR, NMR, TG, DSC, MALDI, SEM, and DLS techniques. Two monomer initiators (glycerol and 1,1,1-tris(hydroxymethyl)propane) have been used, and the polymerization was obtained by anionic ring-opening polymerization of the glycerol carbonate, with CO₂ liberation leading to a branched polyether. The hyperbranched polymer was employed as a macroinitiator to initiate the ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone, resulting in the multiarm star copolymers. The structures for the nanocopolymers were proposed based on nuclear magnetic resonance results. Hemolytic studies revealed that the copolymers do not have hemolytic activity. The copolymers were tested for safety against human cells and toxicity in cancer cells. The tests indicated that they are safe for in vivo applications and do not have anti-cancer efficiency, corroborating their purpose as a polymeric support for drug delivery.

Keywords Polyglycerol · PolyCaprolactone · Nanocopolymers · Drug delivery

✉ Carla Verônica Rodarte de Moura
carla@ufpi.edu.br

Diego Botelho Campelo Leite
botelho.quimica@gmail.com

Edmilson Miranda de Moura
mmoura@ufpi.edu.br

Edvani Curti Muniz
munizec@ufpi.edu.br

Edson Cavalcanti da Silva Filho
edsonfilho@ufpi.edu.br

Anderson Nogueira Mendes
anderson.mendes@gmail.com

Lívia Alves Filgueiras
livia.filgueirass@gmail.com

Adegildo Rolim de Abreu Júnior
abreu.jr.18@gmail.com

Juan Carlos Ramos Gonçalves
juan.goncalves@academico.ufpb.br

Karinne Kelly Gadelha Marques
karinnegadelha@hotmail.com

Marianna Vieira Sobral
mariannavbs@gmail.com

André Luis Menezes Carvalho
aluismenezes@ufpi.edu.br

¹ Department of Chemistry, Post Graduation Program in Chemistry, Federal University of Piauí, Av. Universitária, Teresina, PI s/no, 64.049-550, Brazil

² Federal Institute of Education, Science and Technology of Maranhão Brazil, Rua Padre Santiago, 100, Santiago, São João Dos Patos, MA ZIP/Code: 65.665-000, Brazil

³ Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Av. Universitária, Teresina, PI s/no, 64.049-550, Brazil

⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, Campus I Lot. Cidade Universitaria, PB, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil

⁵ Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Piauí, Av. Universitária, Teresina, PI S/n°, 64.049-550, Brazil



Advanced amphotericin-B gel formulation: An efficient approach to combat cutaneous leishmaniasis

Carla Veronica Rodarte de Moura ^{a,*}, Diego Botelho Campelo Leite ^{a,b}, Edvani Curti Muniz ^a, Anderson Nogueira Mendes ^c, Livia Alves Filgueiras ^c, Adegildo Rolim de Abreu Júnior ^d, Juan Carlos Ramos Gonçalves ^{d,e}, Karinne Kelly Gadelha Marques ^e, Marianna Vieira Sobral ^{d,e}, Paulo Monteiro Araujo ^f, Marcia dos Santos Rizzo ^{f,g}, Fernando Aecio de Amorim Carvalho ^h, Michel Muallem de Moraes Alves ⁱ, André Luis Menezes Carvalho ^j, Matheus Oliveira do Nascimento ^f

^a Department of Chemistry, Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

^b Federal Institute of Maranhão, São João dos Patos, MA, Brazil

^c Department of Biophysics and Physiology, Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

^d Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

^e Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products, Federal University of Paraíba, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

^f Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

^g Interdisciplinary Laboratory for Advanced Materials, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

^h Antileishmanial Activity Laboratory, Medicinal Plants Research Center, Department of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

ⁱ Antileishmanial Activity Laboratory, Medicinal Plants Research Center, Department of Veterinary Morphophysiology - Federal University of Piauí, Teresina, PI, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Copolymers
Drug carrier
Amphotericin-B
Leishmaniasis
Poloxamer-407
Nanoparticles

ABSTRACT

Several drug release studies are continuously carried out to minimize pharmacological limitations, such as insolubility in water and gastrointestinal irritability. This study focused on the development of gels for the administration of amphotericin-B (AmB) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. Two gels were prepared from copolymers (polyglycerol and ε-caprolactone) incorporated with AmB. The gels were characterized by FTIR, NMR, TG, and DSC techniques. The incorporation of AmB into the copolymers showed that the medicine remained in the monomeric form, which is the least toxic. The AmB loading presented values of about 31 % (w: w) for TMP-HPG-PCL and for GLY-HPG-PCL, while the encapsulation efficiency was 93 % for both copolymers. According to the release profile, it is observed that, after 48 h, the percentage of AmB released for pure amphotericin, TMP-HPG-PCL-AmB, and GLY-HPG-PCL-AmB were 100 % ± 6 %, 100 % ± 1.5 %, and 47 % ± 13 %, respectively. Hemolytic study, Cytotoxic Evaluation showed that TMP-HPG-PCL and GLY-HPG-PCL were not toxic to both cell lines (HaCat and MCF-7). These results suggest that the copolymers are safe for in vivo applications being able to act as a drug carrier that have low water solubility corroborating their purpose of polymeric support in the transport of drugs. TMP-HPG-PCL-POL-AmB and for GLY-HPG-PCL-HPG-POL-AmB were used in female mice (BALB/c) infected with *Leishmania major* foremost for 40 days, and it was found that in animals treated with the gel/copolymer/AmB, there was a reduction in the number of parasites of around 70 %. Histopathological studies showed the presence of small intralobular granulomas and moderate Kupffer cell hypertrophy/hyperplasia. The results show that the TMP-HPG-PCL-POL-AmB and for GLY-HPG-PCL-HPG-POL-AmB efficiently combats cutaneous leishmaniasis.

1. Introduction

Leishmaniasis is one of the leading causes of disease and death, with

an annual incidence of >2 million new cases/year and 350 million people at risk in >100 countries [1,2]. One of the variations of this disease is cutaneous leishmaniasis (CL), which is defined by the presence

* Corresponding author.

E-mail address: carla@ufpi.edu.br (C.V.R. de Moura).

<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2025.214220>

Received 1 October 2024; Received in revised form 20 January 2025; Accepted 2 February 2025

Available online 21 February 2025

2772-9508/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Article

PVP as an Oxygen Vacancy-Inducing Agent in the Development of Black 45S5 Bioactive Glass Fibrous Scaffolds Doped with Zn and Mg Using A-HSBS

Keila C. Costa ^{1,2,*}, Maria Geórgia da S. Andrade ¹, Rondinele N. de Araujo ², Adegildo R. de Abreu Junior ³, Marianna V. Sobral ³, Juan Carlos R. Gonçalves ³, Bianca V. Sousa ⁴, Gelmires A. Neves ² and Romualdo R. Menezes ^{2,*}

- ¹ Graduate Program in Materials Science and Engineering (PPG-CEMat), Federal University of Campina Grande (UFCG), Av. Aprígio Veloso-882, Bodocongó, Campina Grande 58429-900, PB, Brazil; maria.georgia@estudante.ufcg.edu.br
- ² Laboratory of Materials Technology, Department of Materials Engineering, Federal University of Campina Grande (UFCG), Av. Aprígio Veloso-882, Bodocongó, Campina Grande 58429-900, PB, Brazil; rondinele.nunes@estudante.ufcg.edu.br (R.N.d.A.); gelmires.neves@ufcg.edu.br (G.A.N.)
- ³ Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Onco Pharmacology Laboratory, Federal University of Paraíba (UFPB), Campus I, Castelo Branco, s/n, University City, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil; abreu.jr.18@gmail.com (A.R.d.A.); mariannavbs@gmail.com (M.V.S.); juan.goncalves@academico.ufpb.br (J.C.R.G.)
- ⁴ Department of Chemical Engineering, Federal University of Campina Grande (UFCG), Av. Aprígio Veloso-882, Bodocongó, Campina Grande 58429-900, PB, Brazil; bianca.viana@ufcg.edu.br

* Correspondence: keila.conceicao@estudante.ufcg.edu.br (K.C.C.); romualdo.menezes@ufcg.edu.br (R.R.M.)



Academic Editors: Keisuke Nakano and Kiyofumi Takabatake

Received: 21 January 2025

Revised: 21 February 2025

Accepted: 25 February 2025

Published: 18 March 2025

Citation: Costa, K.C.; Andrade, M.G.d.S.; Araujo, R.N.d.; Abreu Junior, A.R.d.; Sobral, M.V.; Gonçalves, J.C.R.; Sousa, B.V.; Neves, G.A.; Menezes, R.R. PVP as an Oxygen Vacancy-Inducing Agent in the Development of Black 45S5 Bioactive Glass Fibrous Scaffolds Doped with Zn and Mg Using A-HSBS. *Materials* **2025**, *18*, 1340. <https://doi.org/10.3390/ma18061340>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Currently, there is an increasing demand for advanced materials that can address the needs of tissue engineering and have the potential for use in treatments targeting tumor cells, such as black bioactive materials in photothermal therapy. Thus, 3D fibrous scaffolds of black 45S5 bioactive glass were produced using the air-heated solution blow spinning (A-HSBS) technique, with polyvinylpyrrolidone (PVP) serving as a spinning aid and an oxygen vacancy-inducing agent. Glass powder with the same composition was synthesized via the sol-gel route for comparison. The samples were characterized using thermogravimetric analysis, X-ray diffraction, FTIR spectroscopy, and scanning electron microscopy, along with in vitro tests using simulated body fluid (SBF), phosphate-buffered saline (PBS), and TRIS solution. The results showed that PVP enhanced oxygen vacancy formation and stabilized the scaffolds at 600 °C. Doping with Zn and Mg ions reduced crystallization while significantly increasing the fiber diameters. Scaffolds doped with Zn exhibited lower degradation rates, delayed apatite formation, and hindered ionic release. Conversely, Mg ions facilitated greater interaction with the medium and rapid apatite formation, completely covering the fibers. The scaffolds showed no cytotoxicity in the MTT assay at concentrations of up to 200 µg/mL for HaCat cells and 0.8 mg/mL for L929 cells. This study demonstrated the effectiveness of using PVP in the production of black bioactive glass scaffolds, highlighting their potential for bone regeneration.

Keywords: black glasses; fibrous scaffolds; air-heated solution blow spinning; inorganic ions

1. Introduction

The 45S5 glass (Bioglass[®]), developed by Larry L. Hench and colleagues, was the first effective material for bone tissue repair [1] and is commercially available from Mo-Sci Corporation, Rolla, MO, USA. Its composition includes SiO₂ (45% by weight), Na₂O (24.5%