



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTITUMORAL EM CÉLULAS DE CÂNCER
GÁSTRICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS
DE *Eugenia patrisii* Vahl**

HERALD SOUZA DOS REIS

BELÉM – PA
2020

HERALD SOUZA DOS REIS

**ATIVIDADE ANTITUMORAL EM CÉLULAS DE CÂNCER
GÁSTRICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS
DE *Eugenia patrisii* Vahl**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado.
Coorientadora: Profa. Dra. Cristine Bastos do Amarante.

BELÉM – PA

2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

R375a Reis, Herald Souza dos.
Atividade antitumoral em células de câncer gástrico e
atividade antioxidante de extratos de *Eugenia patrisii* vahl /
Herald Souza dos Reis. — 2020.
50 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado
Coorientação: Prof^a. Dra. Cristine Bastos do Amarante
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Belém, 2020.

1. Câncer gástrico; MMP-2; MMP-9; eugenia; planta da
Amazônia.. I. Título.

CDD 615.321098115

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: 21 de setembro de 2020

Orientador:



Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado
Laboratório de Biologia Estrutural (ICB-UFPA)

Banca Examinadora:



Prof.ª Dr.ª Carla Speroni Ceron
Doutora em Farmacologia
Departamento de Alimentos e Medicamentos (UNIFAL)



Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira
Doutor em Toxicologia
Laboratório de Toxicologia (ICS-UFPA)

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre apoiaram e incentivaram meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

REIS, H. S. **Atividade antitumoral em células de câncer gástrico e atividade antioxidante de extratos de *Eugenia patrisii* vahl**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

Diversas drogas antineoplásicas são de origem natural ou de compostos derivados e as plantas são uma das fontes primárias de substâncias para esses fármacos. Estudos com vegetais da família Myrtaceae, demonstraram diversos efeitos, como anticâncer e antioxidante. Uma planta desta família que apresenta atividades biológicas é a *Eugenia patrisii* Vahl, popularmente conhecida como Ubaia-rubi-da-amazônia, uma planta nativa da Região Amazônica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antitumoral e antioxidante de extratos hidroalcoólicos da folha e do caule da espécie vegetal *E. patrisii*. O perfil químico dos extratos foram feitos através de cromatografia de camada delgada. A atividade antioxidante foi avaliada pelo teste do DPPH. Para a atividade antitumoral, foi realizado teste de viabilidade celular utilizando o método do MTT em linhagens de câncer gástrico (ACP02, ACP03 e AGP01) e linhagens normais (VERO e MN01). Também foram realizadas zimografia em gel para avaliar a atividade de MMP-2 e MMP-9. Os dados obtidos foram analisados no programa Graph Pad Prism versão 8.0. Os testes utilizados foram análise de variância (ANOVA) e Test *t* Student, sendo considerado significativo $p < 0,05$. As placas derivatizadas da cromatografia de camada delgada mostraram a presença de terpenos, flavonoides, compostos fenólicos e ausência de cumarinas e alcaloides. Os extratos mostraram possuir capacidade antioxidante através do ensaio do DPPH. No teste de viabilidade celular os extratos apresentaram uma alta potência frente as linhagens tumorais gástricas e não afetando a linhagem normal. Além disso o extrato da folha diminuiu a atividade MMP-2 e MMP-9 em gel. Os extratos possuem terpenos, flavonóides e compostos fenólicos que possuem atividade antioxidante de 82% comparado com o padrão e antitumoral contra as linhagens gástricas ACP03 e AGP01, com potencial de isolamento de compostos de interesses farmacológicos.

Palavras-chave: Câncer gástrico; MMP-2; MMP-9; eugenia; planta da Amazônia.

ABSTRACT

REIS, H.S. **Antitumoral activity in gastric cancer cells and antioxidant activity of *Eugenia patrisii* vahl extracts.** Master's Dissertation, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2020.

Several antineoplastic drugs are natural origin or from derived compounds and plants are one of the primary sources of substances for this sort of drugs. Studies with Myrtaceae family plants, demonstrated several effects such as anticancer and antioxidant. A plant in this family that may have biological activities is *Eugenia patrisii* Vahl, popularly known as Ubaia-rubi-da-amazônia, a plant native to the Amazon Region. Therefore, the work objective was to evaluate the antitumor and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of the leaf and stem of the *E. patrisii* species. The chemical profile of the extracts was done using thin layer chromatography. The antioxidant activity was assessed by the DPPH test. For antitumor activity, a cell viability test was performed using the MTT method on gastric cancer lines (ACP02, ACP03 and AGP01) and normal lines (VERO and MN01). Gel zymography was also performed to assess the activity of MMP-2 and MMP-9. The data obtained were analyzed using the Graph Pad Prism program version 8.0. The tests used were variance analysis (ANOVA) and Test t Student, with $p < 0.05$ being considered significant. The plates derived from thin layer chromatography showed presence of terpenes, flavonoids, phenolic compounds and absence of coumarins and alkaloids. The extracts were shown to have antioxidant capacity through the DPPH assay. In the cell viability test, the extracts showed a high potency against gastric tumor lines and did not affect the normal line. In addition, the leaf extract decreased MMP-2 and MMP-9 activity in gel. The extracts have terpenes, flavonoids and phenolic compounds that have an antioxidant activity of 82% compared to the standard and antitumor against gastric lines ACP03 and AGP01 with the potential to isolate compounds of pharmacological interest.

Keywords: Gastric câncer; MMP-2; MMP-9; eugenia; amazon plant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
1.1 CÂNCER	8
1.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO CÂNCER GÁSTRICO	13
1.3 PRODUTOS NATURAIS E COMBATE AO CÂNCER.....	18
1.4 <i>EUGENIA PATRISII</i> VAHL (UBAIA).....	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 GERAL	23
2.2 ESPECÍFICOS	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL	24
3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	24
3.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	25
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH).....	26
3.5 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR (REDUÇÃO DE MTT)	27
3.6 ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE MMP-2 E MMP-9	28
3.7 ANÁLISE DE DADOS	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE).....	29
4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH).....	33
4.3 VIABILIDADE CELULAR (REDUÇÃO DE MTT).....	35
4.4 ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE MMP-2 E MMP-9 (ZIMOGRÁFIA).....	40
5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças causadas por disfunções genéticas onde genes mutados com erros nos processos bioquímicos provocam a proliferação desordenada de células (Snustad & Simons, 2017). O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, ficando somente atrás das doenças cardiovasculares (OMS, 2018) e foi responsável por 9,6 milhões de óbitos em 2018. Dentre os cânceres com maior taxa de mortalidade estão os de pulmão (1,76 milhão de mortes), colorretal (862 mil mortes) e estômago (783 mil mortes) (OPAS, 2018). As principais intervenções no tratamento de câncer são a cirurgia, quimioterapia utilizando fármacos e radioterapia. A quimioterapia apresenta muitos efeitos adversos aos pacientes, principalmente devido a inespecificidade das drogas. Também é visto que algumas drogas mostram não agir da mesma forma nos pacientes e além disso os cânceres podem desenvolver resistência aos fármacos, por esses motivos a descoberta de novas drogas é essencial (Saeed et al., 2015).

A busca por compostos que tenham alta especificidade na morte de células tumorais é o objeto de vários estudos atuais. Diversas drogas antineoplásicas são de origem natural ou de compostos derivados. O reino vegetal é uma das fontes primárias de substâncias para fármacos (Costa-lotufo et al.; 2010). Medicamentos como Vimblastina, Podofilotoxina, Camptotecina e Paclitaxel foram todos isolados de plantas e são usados para o tratamento quimioterápico de cânceres como os de testículo, pulmão, ovário, colon e câncer de mama, comprovando a importância desses metabólitos no combate dessas neoplasias (Costa-lotufo et al., 2010; Rocha, 2013; Montanari et al., 2001).

Diversas plantas brasileiras demonstram potencial para numerosas aplicações biológicas a partir de seus derivados. Estudos com vegetais da família Myrtaceae, demonstraram diversas atividades como anticâncer, antioxidante, anti-helmínticos (De Araujo et al., 2019). A Ubaia-rubi-da-amazônia (*Eugenia patrisii* Vahl) é uma planta nativa da Amazônia pertencente a essa família que apresenta potencial para atividades biológicas baseado em outros estudos (Da Silva et al., 2017; Silva et al; 2007). Portanto o objetivo deste trabalho será avaliar a atividade antitumoral e antioxidante do extrato hidroalcoólico da espécie *E. patrisii*.

1.1 CÂNCER

1.1.1 Conceito

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças. Nelas as células cancerosas são definidas por duas propriedades hereditárias: reproduzem-se desobedecendo aos limites normais da divisão celular e, invadem e colonizam regiões normalmente destinadas a outras células (Albert *et al.*, 2010). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), essas doenças são responsáveis por uma em cada seis mortes no mundo. A taxa de mortalidade em países de baixa e média renda é alta, sendo aproximadamente 70% de todas as mortes do mundo, provavelmente devido a descoberta tardia da doença, quando em geral encontra-se em metástase, inviabilizando a cura. (OPAS, 2018)

O aparecimento do câncer é bastante distinto podendo ser causado por agentes físicos (radiação ultravioleta), químicos (tabagismo e alcoolismo) e biológicos (infecções por vírus, bactérias ou parasitos), além dos fatores hereditários. Contudo, somente 5 a 10% dos cânceres são resultantes de problemas genéticos hereditários (Anand *et al.*, 2008). Alguns fatores como alto índice de massa corporal, baixo consumo de frutas e vegetais, falta de atividade física e uso de álcool e tabaco, e a idade são os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença (OPAS, 2018). O envelhecimento é tido como um dos principais fatores para o desenvolvimento do câncer, ele aumenta drasticamente as chances de aparecimento da doença, principalmente porque os mecanismos de reparação celular não são tão eficazes como nos indivíduos jovens (OPAS, 2018). Além disso, é necessário um microambiente com determinadas condições como a autoproiferação descontrolada, defeitos nos genes reguladores da divisão celular, defeitos nas vias de morte celular, angiogênese e manutenção de vascularização além da dispersão das células para outros tecidos para que o câncer o apareça e se espalhe para outros tecidos (Rakoff-nahoum, 2006).

1.1.2 Quadro do câncer na atualidade

A incidência e morte por câncer no mundo vem aumentando seguindo o aumento populacional. Somente em 2018 houve 9,6 milhões de mortes, sendo responsável por aproximadamente 20% de óbitos no mundo todo (OPS/OMS). As taxas de incidência e de mortalidade do câncer diferem consideravelmente, por exemplo, considerando todas as idades e ambos os sexos os cinco cânceres mais frequentes são os de pulmão (11,6%), mama (11,6%), colorretal (10,2%), próstata (7,1%), estômago (5,7%) mas quando se considera as taxas de mortalidade os dados apresentam diferenças: pulmão (18,4%), colorretal (9,2%), estômago (8,2%), fígado (8,2%), mama (6,6%), onde destacam-se o câncer de estômago como o terceiro causador de mortes e o quinto em incidência (Figura 1) (OMS/Globocan, 2018).

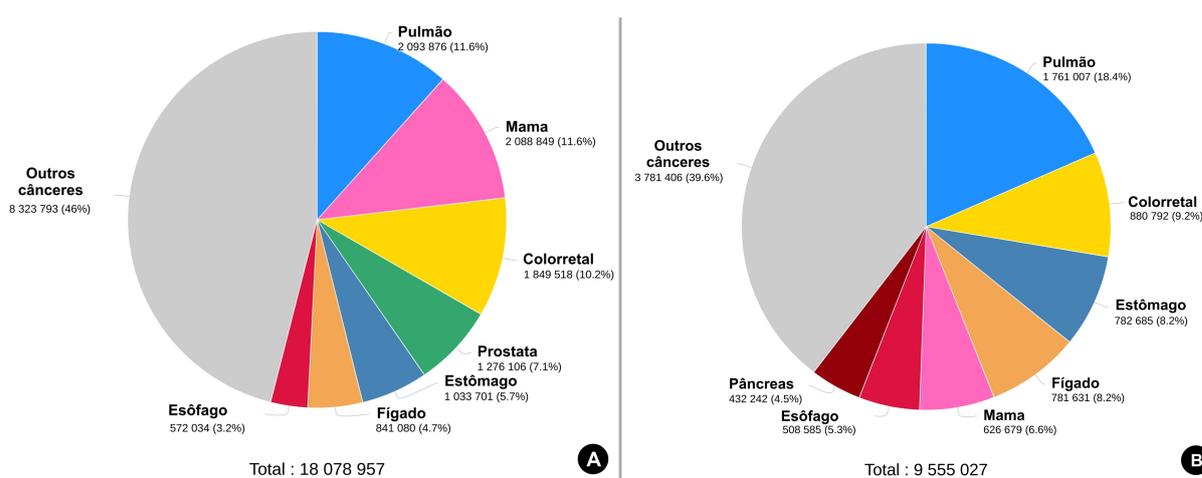


Figura 1. Número mundias estimados em 2018 para novos casos (A) e morte (B) incluindo todos os cânceres, sexo e idades. Fonte: OMS/Globocan, 2018.

Alguns cânceres no Brasil possuem a taxa de mortalidade quase equivalente a sua incidência, como os de fígado, estômago e pâncreas, o que significa que a grande maioria das pessoas diagnosticadas com esses tipos de câncer dificilmente sobreviverão ou terão tempo de sobrevida reduzido (OMS/Globocan 2018, INCA 2019).

Os registros de casos de cânceres são diferentes para cada região do mundo e também em cada região do país. Na região norte por exemplo, o segundo câncer mais frequentes entre os homens é o de estômago, quando comparado a média nacional, este sobe de 4º para o 2º com maior incidência (Figura 2), sendo assim um câncer muito estudado por pesquisadores da região.

A. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma*

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%		
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%		
Cólon e Reto	20.540	9,1%			Mulheres		Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%		
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%		
Cavidade Oral	11.200	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%		
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%		
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%		
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%		
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%		
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%		

* Números arredondados para múltiplos de 10

B. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo na Região Norte, exceto pele não melanoma*

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%		
Próstata	2.770	28,6%	Homens		Colo do útero	2.060	21,6%		
Estômago	1.110	11,4%			Mulheres		Mama feminina	1.970	21,0%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	870	9,0%			Cólon e Reto	590	6,3%		
Cólon e Reto	510	5,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	590	6,3%		
Leucemias	410	4,2%			Estômago	550	5,9%		
Cavidade Oral	360	3,7%			Leucemias	320	3,4%		
Sistema Nervoso Central	300	3,1%			Sistema Nervoso Central	280	3,0%		
Esôfago	250	2,6%			Ovário	310	3,3%		
Laringe	240	2,5%			Glândula Tireoide	260	2,8%		
Linfoma não Hodgkin	210	2,2%			Corpo do útero	230	2,4%		

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados de 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*. 3A: Brasil, 3B: Região Norte. Fonte: INCA, 2019.

Para os anos do triênio 2020-2022, estimou-se 13.360 novos casos de câncer de estômago entre os homens, com 12,81 casos a cada 100 mil homens. Para as mulheres os números são relativamente mais baixos com 7.870 novos casos e um risco estimado de 7,34 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2019).

1.1.3 Câncer Gástrico

1.1.3.1 Tipos de câncer gástrico (*intestinal e difuso*)

O câncer gástrico possui diversos tipos como os adenocarcinomas, sarcomas, linfomas e outros padrões de tumores, cada um com potencial evolutivo e tratamento diferente. O adenocarcinoma é o tipo histopatológico mais comum do câncer gástrico sendo responsável por 95% dos casos de neoplasias malignas. Ele está subdividido em dois tipos: : o difuso de Lauren e o intestinal (Instituto Nacional do Câncer, 2019).

O adenocarcinoma gástrico do tipo difuso tem como característica grande poder invasivo, crescimento nas submucosas, metástases precoces e se originam na mucosa gástrica normal. Mulheres jovens com tipo sanguíneo A são as mais acometidas por este tipo de adenocarcinoma, e ele também está associado a um pior prognóstico. Este tipo é composto por aglomerados solitários ou pequenos de células sem formação de glândulas (Lauren, 1965; Sitarz et al, 2018).

O adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal está associado a gastrite atrófica crônica e metaplasia intestinal. É um tumor glandular, semelhante ao carcinoma de cólon, entretanto mais diferenciado, acometendo mais os homens, principalmente aqueles com idade avançada e evolui geralmente de lesões pré-malignas. (Lauren, 1965; Ministério da Saúde, 2018; Sitarz et al, 2018).

Na Amazônia, a literatura descreve a caracterização citogenética de três linhagens de adenocarcinoma gástrico de ambos os tipos: AGP01, ACP02 e ACP03. A linhagem AGP01 foi estabelecida a partir de células cancerígenas do líquido ascítico, classificada como do tipo intestinal. As outras duas linhagens foram estabelecidas de adenocarcinoma primário, sendo a ACP02 classificada como tipo difuso e a ACP03 como tipo intestinal (Leal et al., 2009).

1.1.3.2 Fatores de risco

No Pará, segundo maior estado do norte e do Brasil, um estudo relacionou a culinária local a ocorrências de câncer gástrico pelo consumo excessivo de amido, alimentos com temperaturas muito elevadas, mal conservados ou com excesso de sal, relacionados a ausência de refrigeração. Elementos na cultura alimentar como o charque, o peixe e o camarão salgado contribuem para essas estatísticas, sendo a dieta portanto um dos fatores de risco da doença (Resende et al., 2006).

Contudo diversos outros fatores estão relacionados ao desenvolvimento do câncer gástrico. A infecção do estômago pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma das principais causas do aparecimento dessa doença. Infecções crônicas induzem inflamação (gastrite atrófica crônica) e lesões pré-cancerosas no revestimento interno do estômago. Outros fatores como idade, gênero, tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade, anemia perniciosa, sangue tipo A, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, pólipos, infecção por vírus Epstein-Barr, exposição ocupacional, situação socioeconômica da região, educação dentre outros também tem papel no desenvolvimento da neoplasia maligna. (Alicandro et al., 2017; American Cancer Society, 2016; Diaconu et al., 2017; Reques et al., 2014; Stewart, 2014).

1.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO CÂNCER GÁSTRICO

1.2.1 Metaloproteinases de Matriz (MMPs)

As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco conhecidas por sua capacidade de clivar um ou vários constituintes da Matriz extracelular (MEC), bem como proteínas não-matrizes. Elas compreendem uma grande família de proteases que compartilham estruturas comuns e elementos funcionais. São produtos de diferentes genes e são essenciais para um funcionamento normal do organismos, mas quando entram em desequilíbrio podem ser altamente prejudiciais (Chambers & Matrisin, 1997)

Entre as enzimas proteolíticas potencialmente associadas à invasão tumoral, os membros da família das MMPs alcançaram uma importância notável devido à sua capacidade de clivar componentes da MEC e das membranas basais, permitindo assim que as células cancerígenas penetrem e se infiltrem na matriz estromal subjacente (Rodylova et al., 2008)

A capacidade das células cancerígenas de invadir outros tecidos e se espalhar para órgãos distantes é uma característica freqüentemente fatal de tumores malignos. As enzimas proteolíticas desempenham um papel fundamental na progressão do câncer, fornecendo acesso às células tumorais para os sistemas vasculares e linfáticos, que apóiam o crescimento do tumor e constituem uma via de escape para maior disseminação (Nabeshina et al, 2002; Woessner et al.; 2000).

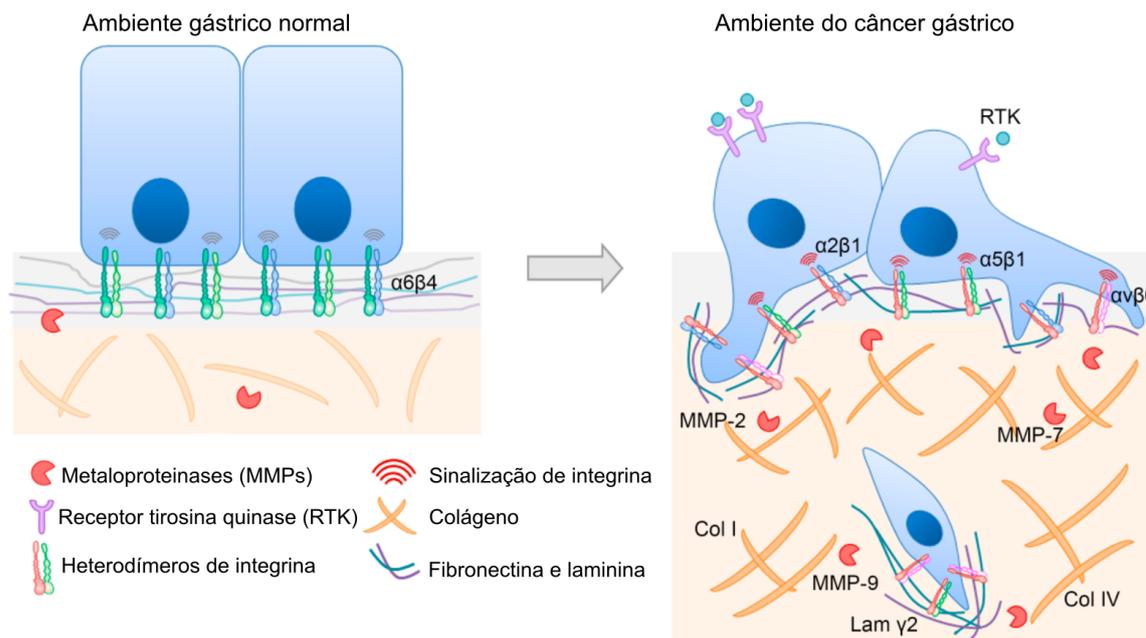


Figura 3. Imagem representativa das principais alterações de MEC-integrina em células de câncer gástrico. A composição da MEC, bem como a expressão e sinalização da integrina, são distintas em contextos normais e em contextos de câncer gástrico. Participantes relevantes para a carcinogênese gástrica são descritos para ilustrar características aberrantes. Resumidamente, durante o desenvolvimento do câncer gástrico, a expressão de alguns heterodímeros de integrina é perdida ($\alpha6\beta4$), enquanto a de outros é aumentada ($\alpha2\beta1$, $\alpha5\beta1$ e $\alpha v\beta6$). Além disso, o aumento da atividade de várias MMPs (MMP-2, MMP-7 e MMP-9) está associado à invasão de células cancerosas. Níveis aumentados de colágenos (Col I e Col IV) e laminina $\gamma2$ também fazem parte de uma assinatura específica de MEC de câncer gástrico). Fonte: Moreira, 2020.

No câncer gástrico as gelatinases MMP-2 e MMP-9 estão mais expressas em pacientes com *Helicobacter pylori* e estão associadas também a um pior prognóstico. Estudos demonstraram que as células cancerosas gástricas infectadas por *H. pylori* aumentam a atividade de MMP-2, MMP-9 e MMP-10 por meio de vias de sinalização dependentes de c-Met e EGFR, induzindo remodelamento da ECM e invasão celular (Costa et al., 2016, Oliveira et al., 2006).

A MMP-9 é amplamente relatada no câncer gástrico e diversos estudos corroboram o seu envolvimento na carcinogênese gástrica. Um estudo mostrou que a marcação de MMP-9 é mais evidenciada em tecidos de carcinomas gástricos do que em tecidos adjacentes saudáveis (Chen et al., 2015). Também foi verificado que

os níveis de MMP-9 foram significativamente mais elevados em soro de pacientes com câncer gástrico quando comparados com pessoas saudáveis. Alguns estudos de meta-análise (Chen et al., 2014; Shen et al., 2014) mostraram que a superexpressão de MMPs, principalmente a MMP-2, MMP-7 e MMP-9, estavam associadas a um pior prognóstico em pacientes com câncer gástrico. (Lee et al., 2008; Soleyman et al., 2014). A MMP-2 também está relacionada ao desprendimento de células cancerosas da parede gástrica (McDonnell et al., 1991), assim como a profundidade da invasão, metástases em linfonodos e metástases distantes do câncer gástrico (Monig et al., 2001).

Apesar do câncer gástrico tipo difuso ter maior poder invasivo, os níveis de MMP-2 e MMP-9 possuem maior frequência no câncer gástrico do tipo intestinal (Hartgrink et al., 2009), o que trás novas perspectivas de estudos para entender essa dinâmica. A associação de MMPs com metástase de câncer despertou considerável interesse, pois representam um alvo atraente para o desenvolvimento de novos fármacos antimetastáticos destinados a inibir a atividade de MMP (Overall & Lopes, 2002;).

1.2.2 Espécies reativas do oxigênio (ERO)

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular, produzindo radicais livres de forma natural ou por uma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Barreiros *et al.*, 2006). No organismo, estão envolvidos em diversos processos biológicos como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, imunidade e defesa celular, entretanto, quando em excesso apresentam efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA (Barreiros *et al.*, 2006; Oliveira & Schoffen, 2010).

A produção de ERO está elevada nas lesões teciduais causadas por traumas, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos, devido a um conjunto de processos como o aumento de enzimas envolvidas na

formação de radicais, a ativação da fagocitose, liberação de ferro e cobre ou interrupção da cadeia transportadora de elétrons (Rock *et al.*, 1996). Dessa forma, encontram-se relacionados com diversas patologias em humanos, como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, AIDS e câncer. (Barreiros *et al.*, 2006; Oliveira & Schoffen, 2010).

Estresse oxidativo é o termo usado quando ocorre um desequilíbrio entre o aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou a diminuição de sua inativação por sistemas antioxidantes endógenos (BARBOSA, K. *et al.*, 2010). A geração das ERO acontece durante processos de oxidação biológica em que são produzidos de maneira controlada em condições fisiológicas, como por exemplo, na respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa para a formação de adenosina trifosfato (ATP) na mitocôndria (TOUYZ *et al.*, 2019).

As ERO fazem a mediação de diversos oncogenes envolvidos em processos inflamatórios, nas transformações malignas das células, na morte celular, proliferação, invasão, formação de vasos e metástase. Dentre os mecanismos que promovem o processo carcinogênico, temos a peroxidação lipídica, que causa alterações na permeabilidade seletiva e estrutura da membrana devido ao ataque de ERO a membrana celular (Cerchiaro & Honório, 2011). Além disso a formação de ERO faz com que os fatores de riscos do câncer se relacionem com as células através de fatores de transcrição NF- κ B (factor nuclear kappa B), proteínas (AP-1), Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa (HIF-1 α), transdutores de sinais e ativadores de transcrição 3 (STAT3), além de outros que são essenciais para o aparecimento da célula mutante. (Gupta *et al.*; 2012).

Os estresse oxidativo pode ser diminuído através da ação de antioxidantes. Essas moléculas conseguem converter as ERO em espécies menos reativas, melhorando o balanço delas e conseqüentemente diminuindo o estresse oxidativo (Cominetti *et al.*, 2011). Antioxidante é definido como a substância que, quando comparada ao substrato oxidável, está presente em baixas concentrações e consegue inibir ou atrasar a oxidação do substrato de maneira eficiente (Diplock *et al.*, 1998).

As substâncias com maiores atividades antioxidantes são os compostos fenólicos, com destaque para as vitaminas A, E e C, que são de origem naturais e são encontradas facilmente em frutas e outros vegetais. Além dos flavanóides, carotenos e outras moléculas que atuam no sequestro de radicais livres, sendo indispensáveis para o funcionamento do organismo (Novaes et al., 2014). Os seres vivos produzem naturalmente antioxidantes que são de extrema importância para o organismo para proteger contra ações oxidativas e também contra radicais livres. (Diplock e colaboradores, 1998).

Animais e vegetais são os principais objetos de pesquisas na busca de compostos antioxidantes (Rocha, 2013) e numerosos antioxidantes naturais foram isolados de diferentes tipos vegetais como cereais, frutas, folhas, raízes, temperos, ervas aromáticas, entre outras (Jayakumar, 2009). Os produtos naturais possuem uma grande quantidade de fitoquímicos e compostos fenólicos que estão associadas a baixa frequência da câncer, principalmente devido a uma efetiva ação aos processos oxidativos (Yildrin, 2001). Por esse motivo a descobertas de substâncias que apresentem atividade antioxidante podem contribuir para uma intervenção terapêutica em diversas doenças como o câncer.

1.3 PRODUTOS NATURAIS E COMBATE AO CÂNCER

O Brasil é detentor da maior diversidade genética vegetal do mundo, com cerca de 55 mil espécies de plantas catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conta com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações. Apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (Fonseca, 2012).

O reino vegetal é o que mais contribui para a descoberta de fármacos e dele se retira muitas substâncias orgânicas ativas. O estudo de plantas tradicionalmente usadas, são importante em dois pontos: um como pesquisa de drogas com potencial quimioterapêutico, e outro para avaliar a toxicidade da planta, sendo uma medida de segurança para o uso popular (Arora *et al.*, 2005).

Velloso (2007) verificou que várias plantas sintetizam metabólitos que podem ser antioxidantes. Diferentes compostos antioxidantes presentes na dieta desempenham importantes funções em retardar o desenvolvimento de doenças crônicas tais como doenças cardiovasculares, câncer, reações inflamatórias e Mal de Alzheimer. Os compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário são ótimos agentes antioxidantes naturais (Atoui *et al.*, 2005). Extratos de frutas, cereais de diferentes vegetais, têm mostrado atividades antioxidantes. (Sun & Ho, 2005).

As plantas produzem produtos naturais que são substâncias do metabolismo secundário que podem pertencer a um único tipo de organismo, ou a um pequeno grupo de organismos geneticamente relacionados (Rocha, 2013). Frequentemente são constituídos por estruturas químicas complexas e com uma orientação espacial bem definida. Os produtos naturais tem sido fonte de alimentos, fragrâncias, pigmentos, inseticidas, fármacos, entre outros e em termos gerais de medicamentos, o reino vegetal é responsável por mais de 25% dos fármacos comerciais.

Numerosos compostos naturais foram identificados a partir do conhecimento etnofarmacológico de algumas plantas e animais, sendo a fitoterapia e a zooterapia muitas vezes o ponto de partida para as pesquisas (Rocha, 2013). Diversos fármacos que são utilizados atualmente no tratamento de diversos tipos de câncer são de origem vegetal, como podemos verificar no Quadro 01.

ESPÉCIE	FÁRMACO	INDICAÇÕES
<i>Catharanthus roseus</i>	Vimblastina Vincristina Vindesina Vinorelbina	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking
<i>Podophyllum peltatum</i> e <i>Podophyllum emodi</i>	Podofilotoxina Teniposídeo Etoposídeo	Câncer de pulmão, ovário e testículo, leucemia linfocítica aguda
<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotecina Topotecano Irinotecano	Câncer de colon
<i>Taxus brevifolia</i>	Paclitaxel Docetaxel	Câncer de mama

Quadro 01 – Produtos Naturais ou fármacos derivados de origem vegetal. Fonte: Montanari (2001), Costa-Lotufo *et al.* (2010), Rocha (2013).

Apesar do considerável arsenal de fármacos existente para o tratamento de cânceres e do sucesso terapêutico em vários esquemas de tratamentos, ainda se busca composto mais eficientes. A maioria dos quimioterápicos usados na terapêutica possuem capacidade de controlar a proliferação celular com baixa especificidade (Almeida *et al.*, 2005). Recentemente, foram identificados fármacos com atividade em mecanismos metabólicos específicos da célula tumoral. Também vêm sendo pesquisados, com sucesso, fármacos que inibem a neovascularização tumoral, que induzem a rediferenciação celular ou que levem a célula tumoral à apoptose (Costa-Lotufo *et al.*, 2010). Com drogas que atuem de forma mais específica e direcionada a células de câncer, os efeitos adversos dos tratamentos serão diminuídos, visto que menos células saudáveis serão impactadas. Por esse motivo que as o reino vegetal ainda precisa ser mais explorado para descobertas de produtos naturais para tratamentos mais eficientes.

1.4 *Eugenia patrisii* Vahl (UBAIA)

A família Myrtaceae, uma das mais importantes da flora brasileira, possui representantes de grande interesse medicinal. Esta família apresenta distribuição pantropical e subtropical, possui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies. No Brasil, existem 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies. É dividida em duas subfamílias, Myrtoideae e Leptospermoideae (Paula et al. 2010). As plantas desta família são encontradas frequentemente nos bancos de areia da Amazônia (Bastos, 1988). Dentre os diversos gêneros da família Myrtaceae, um dos com a maior diversidade de espécies é o gênero *Eugenia*. Neste gênero encontra-se plantas como o jambo, a goiaba, a pitanga, a jabuticaba e a ubaia (*Eugenia patrisii* Vahl).

A ubaia é uma planta pouco conhecida, ainda permanece na categoria de “fruta-do-mato”, pois não são cultivadas e nem aparecem em feiras livres. Em geral é mais popular entre os colecionares de planta ornamentais, devido a sua folhagem densa e verde e ramos jovens avermelhados. A *E. patrisii* Vahl está distribuída pela Amazônia, Guianas, Bolívia e Peru. É uma espécie silvestre que tem por habitat natural o subosque da mata ou da capoeira, onde ocorre de forma bastante dispersa (Cavalcante, 1988).

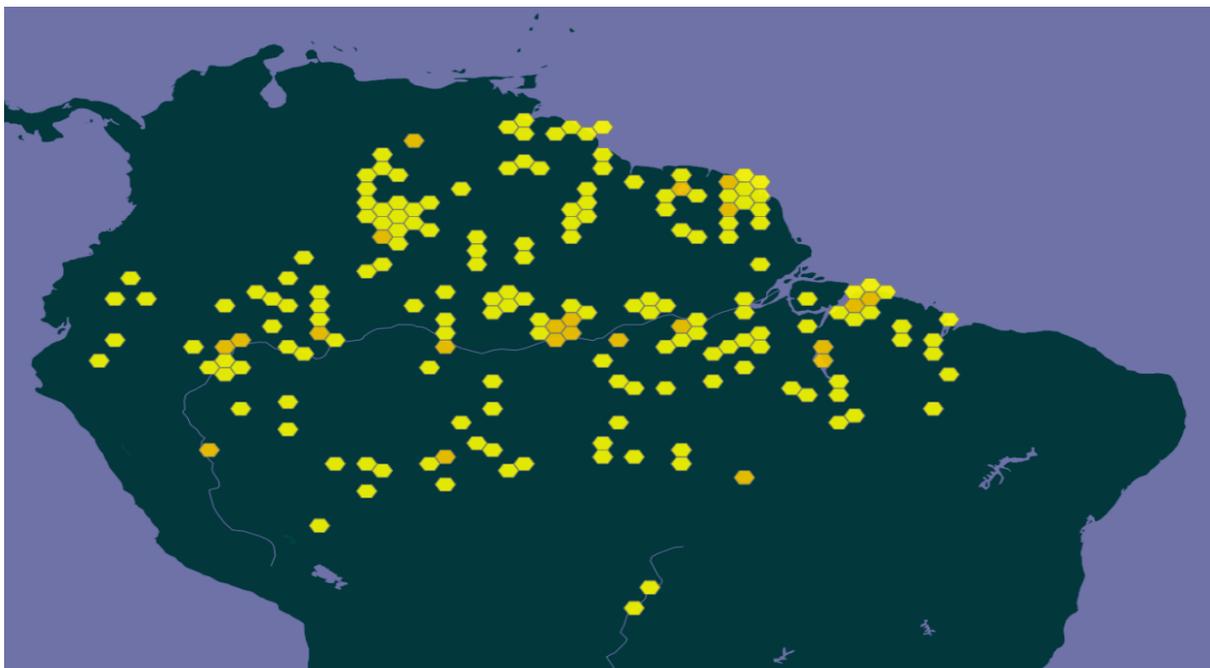


Figura 4. Distribuição de *E. patrisii* Vahl na América do Sul, com aparecimentos no Brasil, Guianas, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. Fonte: Global Biodiversity Information Facility

A planta é um arbusto ou árvore com tamanho aproximado de 1 a 8 metros de altura, as vezes podendo chegar até 15m, com o tronco delgado e a copa da árvore não muito densa. Ela apresenta folhas simples, opostas, elípticas, variáveis de tamanho na mesma planta, de 4-12cm de comprimento por 2-7cm de largura, agudo-acuminadas no ápice, obtuso-arredondadas na base. O fruto da ubaia possui um formato variando de arredondado para periforme com coloração avermelhada-intensa, medindo cerca de 2,5 cm – 3,0 cm. A sua casca é muito brilhante e lisa, a polpa também é vermelha sendo succulante, com ótimo sabor e aroma. É uma fruta utilizada para preparação de sucos, sorvetes e geléias. (Cavalcante, 1988; Rosário et al.; E-jardim, 2008).

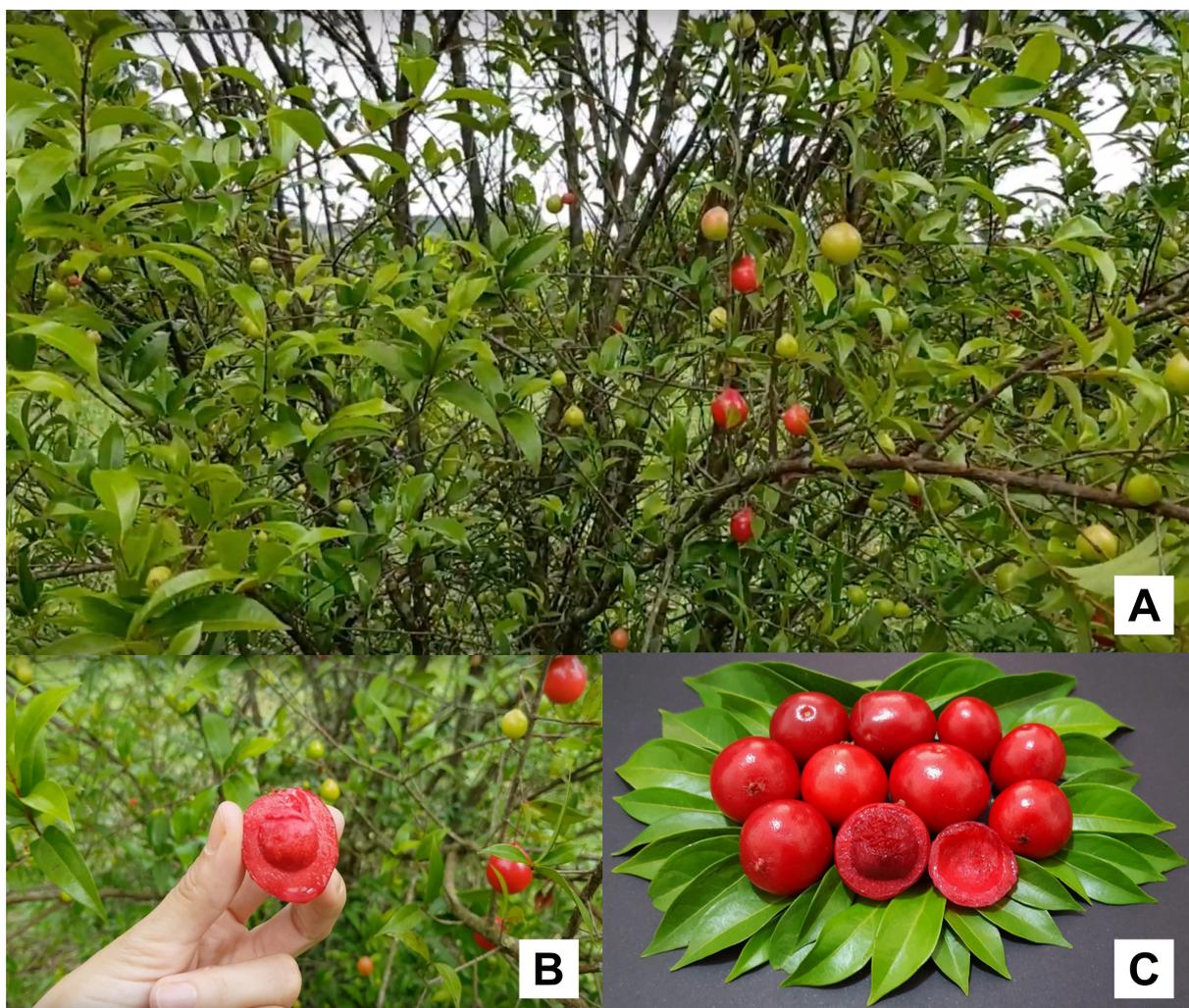


Figura 5. Imagens de um espécime de *E. patrisii* mostrando as folhas, caules e frutos. **(A)** Árvore com 3 metros de altura, com detalhes nas folhas e caules; **(B)** Destaque do fruto retirado da árvore com secção lateral com a planta ao fundo; **(C)** Destaque nas frutas e nas folhas de *E. patrisii*. **Fonte:** Madame das frutas (2019) e Giacon (2017).

Espécies da família Myrtaceae destacam-se como ricas fontes de óleos essenciais com importantes atividades biológicas como antifúngicas, antibacteriana e com grande potencial antioxidante (Carneiro et al., 2017; Dos Santos et al., 2018; Salvador et al., 2011). Estudos sobre a a composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae, mostrou que ela possui fenilpropanóides como carvacrol, timol, eugenol e cinamaldeído, além de atividades antimicrobiana, antioxidante, antifúngica e antiviral. O óleo essencial de cravo-da-índia também possui propriedades antiinflamatórias, citotóxicas, repelentes de insetos e propriedades anestésicas (Chaieb et al., 2007). Outra planta da mesma família a *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum – Myrtaceae, após triagem fitoquímica foram identificados compostos fenólicos, taninos e flavonóides (Paula et al., 2008).

Pouquíssimos estudos de atividades biológicas foram realizados com *E. patrisii*. Os trabalhos encontrados na literatura em geral se referem ao óleo essencial da planta, onde o mesmo mostrou serem citotóxicos frente a linhagem celular de câncer colorretal (HCT-116), assim como possuir atividade antioxidante (Da Silva et al., 2017). Por outro lado, estudos com outras plantas da mesmo família como a *Blepharocalyx salicifolius* (infusão das folhas), mostrou atividades antibacterianas (contra *Staphylococcus aureus* e *Echerichia coli*), anti-inflamatórias, antinociceptivas, antiespasmódicas e de trânsito intestinal (Limberger et al., 2001). Sendo assim, a ubaia tem grande potencial em possuir compostos antioxidantes e antitumorais, visto que diversas espécies dessa família têm sido estudadas em relação aos seus aspectos químicos e farmacológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade antitumoral em linhagens gástricas e atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos da espécie vegetal *Eugenia patrisii* Vahl.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter extratos hidroalcoólicos da folha e do caule de *Eugenia patrisii* (Ubaia);
- Realizar a caracterização química dos extratos;
- Avaliar atividade citotóxica dos extratos etanólicos de *E. patrisii* em linhagens tumorais gástricas primárias de AGP01 (ascite maligna), ACP02 (adenocarcinoma tipo difuso) ACP03 (adenocarcinoma tipo intestinal), normal de MN01 e VERO (células renais de macaco verde africano);
- Investigar a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólico da folha e do caule;
- Avaliar o potencial inibitório do extrato hidroalcoólico da folha sobre as MMPs 2 e 9.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL

As amostras de folha e caule de *E. patrisii* Vahl foram coletadas em agosto de 2018, no horário de 15 as 18 horas em coleta única, nas margens direito do Rio Tocantins (5°18'35.6"S 49°07'02.6"W), no município de Marabá, região sudeste do Estado do Pará. As partes botânicas foram retiradas de cinco espécimes diferentes ao longo do cultivo. As folhas e caules foram acondicionados em sacos plásticos, separadamente e levadas para o laboratório do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará – Campus Marabá Rural, onde foram secos em estufa com circulação de ar a temperatura de 40° C até atingir peso constante. Após desidratação, o material seco foi triturado em liquidificador industrial e acondicionado ao abrigo da luz e umidade. Espécimes foram enviados para especialistas para identificação sistemática na Universidade Federal do Maranhão onde sua exsicata foi feita com o número de 11.588 e encontra-se no Herbário do Maranhão – MAR.

3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos hidroalcoólicos da folha e caule foram obtidos por maceração (sem agitação), utilizando o material triturado e como solvente o etanol 70%. Pesou-se 150g de cada uma das amostras botânicas e foram depositadas em béqueres com 750ml do solvente extrator. O material permaneceu em contato com o solvente por 48h. Após esse período os extratos foram filtrados com auxílio de papel filtro. Foram realizados três extrações de 48h de cada material. A seguir, os extratos foram concentrados em rotaevaporador e congelados a -80°C no volume de 15 ml em tubos falcon de 50ml. Por fim, os extratos foram liofilizados e estocados em forma de pó em frascos de penicilina cobertos com parafina plástica (Parafilm) a -80°C até o uso nos ensaios. As concentrações estudadas foram feitas conforme a metodologia de cada teste realizado.

3.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os perfis químicos dos extratos de *Eugenia patrisii* Vahl foram obtidos em sistema robotizado de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), composto pelos módulos de aplicação Automatic TLC Sample 4 (ATS4) e o fotodocumentação TLC Visualizer da marca CAMAG (Muttentz, Switzerland).

Para a análise, alíquotas de 50 µg/inóculo dos extratos de folha e caule de *E. patrisii* foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel Alumínio F-254 60 Å da SILICYCLE (Quebec, Canadá) de dimensões 5x10 cm juntamente com 0,2 µg/inóculo do respectivo padrão de classe de metabólitos avaliada. As cromatoplasmas foram eluídas em cuba de vidro CAMAG (Muttentz, Switzerland) em sistema isocrático com percurso cromatográfico de 70 mm de diclorometano:metanol (97:3) para avaliar a presença de terpenos e acetato-de-etila:acetona:água:ácido-fórmico (80:10:5:5) para avaliar a presença de flavonoides, compostos fenólicos, cumarinas e alcaloides, assim como o potencial antioxidante por autografia ao derivatizar a cromatoplasma com DPPH 0,6 mM (Wagner & Bladit, 2001).

Após eluídas, as cromatoplasmas foram fotodocumentadas nos comprimentos de onda de 254 nm, de 366 nm e de luz visível, derivatizadas com reveladores seletivos para cada classe de metabólitos avaliados e novamente fotodocumentadas. Para o tratamento das imagens utilizou-se o software WinCats 1.4.6. Dados sobre padrões, reveladores e classes avaliadas, assim como as modo de identificação, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros para identificação de classes de metabólitos.

Padrão	Classe	Revelador / Seletivo	Coloração / Visualização
β-amirina	Terpeno	VAS ¹	Roxa / Visível
Rutina	Fenólico	FBS ²	Marrom / Visível
Rutina	Flavonoide	NP/PEG ³	Amarelo-Verde/UV 366 nm
Esculina	Cumarina	Hidróxido de Potássio (KOH) 5%	Azul / UV 366 nm
Brucina	Alcaloide	Solução Dragendorff	Laranja / Visível

Legenda: ¹VAS (Vanilina / Ácido Sulfúrico); ²FBS (Fast Blue B Salt); ³NP/PEG (solução metenólica com 1% de 2-aminoetil difenilborinato (p/v) + solução etanólica com 5% de polietilenoglicol (p/v).

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)

A atividade antioxidante do extrato foi avaliada a partir do método do DPPH. (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). O DPPH é um radical livre que em solução apresenta coloração púrpura, que na presença de moléculas que exibam atividade antioxidante pode sofrer redução formando o difenil-picril-hidrazina de cor amarela (Vincentino & Menezes, 2007). O produto da reação foi quantificado em espectrofotômetro em um comprimento de onda de aproximadamente 515 nm.

Primeiramente, foi feita uma curva de DPPH (6,25 a 400 µg/mL), objetivando avaliar a mudança colorimétrica que ocorre após redução do mesmo. Em seguida, três curvas foram feitas, duas com as amostras e outra utilizando um antioxidante padrão (trolox), todas nas concentrações de 428 µg/mL para no final obter a concentração da amostra e do padrão capaz de decrescer a absorvância inicial do DPPH a 400 µg/mL em 50% (IC50). As leituras foram realizadas em triplicata após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Os valores de absorvância foram convertidos em porcentagem de Sequestro de radical livre (SRL), a partir da equação:

$$\% \text{ SRL} = \{[\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})] \times 100\} / \text{Abs}_{\text{controle}} \quad (1)$$

Onde $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorvância inicial da solução de DPPH, $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorvância da mistura (DPPH+extrato) e $\text{Abs}_{\text{branco}}$ é a absorvância apenas do solvente utilizado (metanol).

3.5 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR (REDUÇÃO DE MTT)

O MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (SIGMA) é um sal tetrazolium que é convertido em cristais azuis de formazan insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, após clivagem por desidrogenases mitocondriais. O produto obtido após clivagem é impermeável às membranas celulares e acumula-se em células viáveis (Fotakis & Timbrell, 2006). Ao adicionar dimetilsulfóxido (DMSO), estes cristais formazan são solubilizados, sendo o produto final da reação lido por espectrofotometria.

A viabilidade das células tratadas com os extratos de *Eugenia patrisii* foram determinadas através do ensaio do sal de tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) que é convertido em cristais azuis de formazan. Foram utilizados linhagens celulares tumorais gástricas humanas, AGP01 (adenocarcinoma ascite maligna), ACP02 (adenocarcinoma gástrico tipo difuso), ACP03 (adenocarcinoma gástrico tipo intestinal), VERO (células renais de macaco verde africano) e MN01 (célula gástrica normal). Elas foram cultivadas em meio DMEM suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em incubadora a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As células foram colocadas em placas de 96 poços com densidade de 5×10^3 células/poço. Após 24 horas de incubação com as células em confluência, elas foram tratadas com os extratos nas concentrações teste (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 µg/ml) e incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C em triplicata. As células de MN01 foram tratadas com concentrações menores após reavaliação dos próximos testes (400; 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 µg/ml), além disso foi usado um grupo controle positivo utilizando a droga antitumoral doxorrubicina a 200 µg/ mL. O tratamento foi avaliado com a adição de 100 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) a 1% e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida, após dissolução do precipitado em 100 µL de DMSO puro, em espectrofotômetro de placa a 570nm.

3.6 ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE MMP-2 E MMP-9

Para avaliar a atividade de extratos de ubaia sobre a atividade de MMP-2 e MMP-9 utilizou-se o ensaio de zimografia em gel contendo gelatina como substrato. O zimograma foi preparado em gel de poliacrilamida a 10% contendo gelatina a 0,1%. Como fonte de MMP-2 e MMP-9 foi aplicado soro fetal bovino (SFB) a 1%. O SFB foi aplicado em 3 pontos (canaletas) do gel. Após eletroforese, os géis foram submetidos a dois banhos de 30 min. com Triton X-100 (2% v/v, Sigma), para remover o SDS do gel. Em seguida, os géis foram divididos em 3 partes. Uma parte foi utilizada como controle e foi incubada em solução Tris (50 mmol/L) contendo CaCl_2 (10 mmol/L), pH 7,4 por 18h a 37°C para permitir a degradação da gelatina presentes nos géis. As outras duas partes foram incubadas com os extratos de Ubaia nas concentrações de 6,25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após 18h, os géis foram colocados em solução corante [metanol (30% v/v), ácido acético (10% v/v) e Coomassie Blue (0,05%)] por 3h para corar de azul a gelatina presente no gel. As fotos dos géis foram realizadas em scanner e a atividade da MMP-2 e MMP-9 incubadas com as diferentes concentrações dos extratos e o gel controle (sem extrato) foram quantificados no programa Image J.

3.7 ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos foram analisados no programa *Graph Pad Prism* versão 5.0. Os testes utilizados foram análise de variância (ANOVA) e Test *t* Student, sendo considerado significativo $p < 0,05$. No teste de MTT os dados foram analisados segundo a média \pm erro padrão da média (EPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCDAE)

As análises cromatográficas por CCDAE permitiram caracterizar os extratos de folha e caule de *E. patrisii* quanto a sua complexidade e composição química. A Figura 6 apresenta as cromatoplasmas derivatizadas com os reveladores seletivos para cada classe de metabólito avaliada que, por comparação com padrões (P), possibilitou a identificação dessas classes na amostra dos extratos da folha (F) e do caule (C).

Na cromatoplasma derivatizada com solução de VAS (vanilina/ácido sulfúrico) é possível perceber a formação de bandas roxas características terpenos entre os Rfs (fatores de retenção) 0,6 e 0,7 no extrato das folhas (F), tal como a do padrão de β -amirina (Figura 6A), que constatam a presença dos mesmos no extrato. Entretanto não foi observado no extrato do caule (C). Do mesmo modo, foi possível constatar a presença de flavonoides pelo aparecimento de bandas alaranjadas nos Rfs 0,5 e 0,6 (somente este último no caule) quando derivatizada com NP/PEG (Figura 6B) e de compostos fenólicos com alta polaridade pelo aparecimento de bandas alaranjadas-vermelhas ao derivatizar com FBS (Fast Blue B Salt) (Figura 6C) em ambos os extratos.

Não foi possível constatar a presença de alcalóides e cumarinas nos extratos. A presença ou ausência dos metabólitos podem ser verificados na Tabela 2. Os extratos também apresentaram acentuado potencial antioxidante em testes por autografia com DPPH (Figura 6D) constatado pelo aparecimento de bandas amarelas indicando a neutralização do radical livre pelos compostos dos mesmos, que pode ser justificada pela presença de compostos fenólicos, como os flavonoides, nos extratos.

É possível observar nas cromatoplasmas uma banda muito forte na base delas, abaixo do Rf 0,1. Isso indica que os componentes que estão na base interagiram mais fortemente com a fase estacionária (sílica) do que com a fase móvel. Apesar do sistema utilizado ser bastante forte ele não foi capaz de arrastar os compostos pela cromatoplasma, indicando que ali há presença de substâncias muito polares

como açúcares e também outras substâncias com alto grau de hidroxilação.

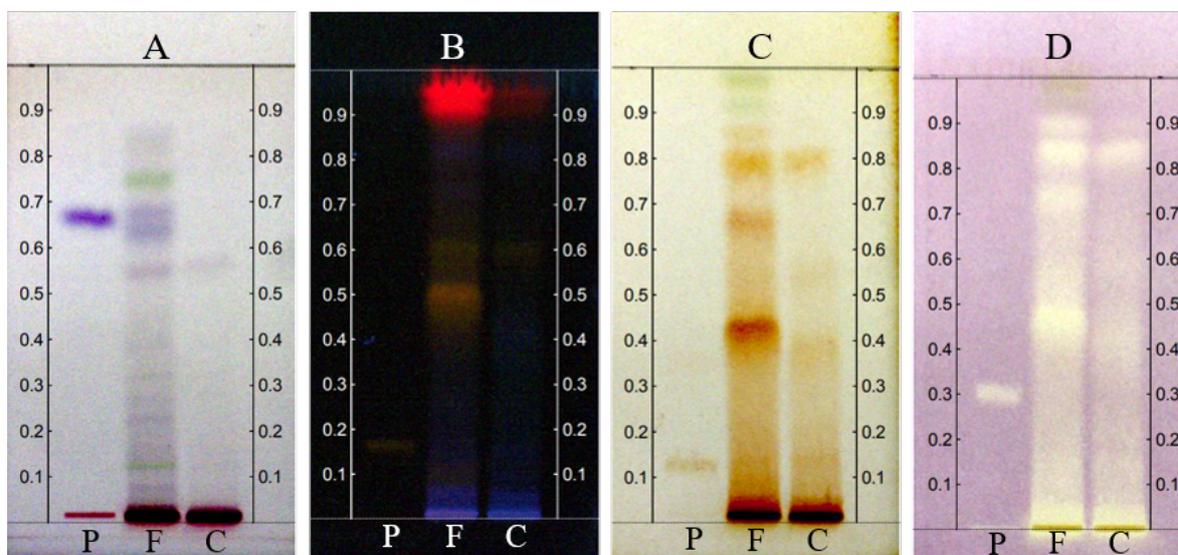


Figura 6 - Cromatoplasmas eluídas e derivatizadas com reveladores seletivos. **(A)** VAS para terpenos com bandas roxas e Rfs entre 0,6 e 0,7; presente na folha e ausente no caule; **(B)** NP/PEG para flavonoides com bandas alaranjadas no Rfs entre 0,5 e 0,6; presente na folha e no caule; **(C)** FBS para compostos fenólicos com bandas alaranjadas-vermelhas; **(D)** DPPH para atividade antioxidante por autografia, com bandas amareladas, indicando neutralização de radicais livres e presença de compostos antioxidantes.. **P:** Padrão, **F:** Extrato da folha, **C:** Extrato do caule.

Tabela 2. Resultado do perfil químico obtido por CCDAE.

Classe de metabólito	Resultado
Terpenos	+
Flavonoides	+
Compostos Fenólicos	+
Cumarinas	-
Alcaloides	-

Legenda: (+) presente; (-) ausente.

Diversas drogas utilizadas no tratamento do câncer hoje são derivadas de plantas. As classes de compostos fenólicos, terpenos e flavanóides encontrados no extrato são percussores de uma infinidade delas. Os terpenos tem como exemplos o paclitaxel e docetaxel que são triterpenos poli-hidroxiado extraído de *Taxus brevifolia*. São substâncias eficientes, onde em concentrações nanomolares destrói as células de câncer de mama e de ovário (Souza, 2004). Eles atuam através de um mecanismo citotóxico, onde promovem a polimerização da tubulina e resulta no bloqueio celular na fase G2/M e assim inibindo a proliferação celular (Ma & Wang, 2009).

Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas responsáveis por cor, aroma e pelos processos antibacterianos, antivirais, antioxidantes, e anti-inflamatórios. Na carcinogênese, os flavonóides atuam em várias vias de transdução de sinal e podem limitar/diminuir a proliferação celular, a produção de novos vasos sanguíneos, a metástase e, também, aumentar a apoptose (Ravishankar et al., 2013; Abotaleb et al., 2019). Maués e colaboradores (2019) identificaram flavanóides de plantas da Amazônia que levaram a apoptose de células de C6 de gliomas através da desregulação do potencial de membrana mitocondrial e da redução da fosforilação de AKT, mostrando que esses compostos são de interesse farmacológico.

Os compostos fenólicos como flavonóides, hidroxicinamatos, hidroxibenzoatos, cumarinas, xantonas, chalconas, estilbenos, ligninas e lignanas têm sido intensamente estudados por seus efeitos antitumorais, pró-apoptóticos e antiangiogênicos (Carocho & Ferreira, 2013). O potencial antioxidante dos compostos fenólicos é de vital importância no tratamento e prevenção do câncer. Esses compostos participam da formação de metabólitos ativos que são utilizados no combate ao câncer, além de sensibilizarem as células cancerígenas aos medicamentos quimioterápicos, ou seja, facilitam a interação fármaco-célula, aumentando o poder da droga (Jafari et al., 2014).

A composição química de *Eugenia patrisii* foi pouco relatado na literatura no óleo essencial das folhas e pequenos caules (Silva et al., 2017). A composição de extratos de folhas, caules e frutos ainda não foram determinados para essa espécie. Por outro lado, diversos estudos no mesmo gênero (*Eugenia*) foram feitos,

mostrando grande variedade de componentes com potencial terapêutico (Rummun et al., 2019; Silva et al., 2017; Subarnas et al., 2012).

Silva e colaboradores (2017), estudaram a composição química dos óleos essenciais de quatro espécies de *Eugenia*: *Eugenia egensis*, *E. flavescens*, *E. polystachya* e *E. patrisii*, através de cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Na *Eugenia patrisii* foram encontrados diversos compostos voláteis, sendo os sesquiterpenos (terpenos) os mais abundantes, com aproximadamente 58% da constituição total do óleo. Esses terpenos possuem atividade antioxidante.

A análise de quinze espécies da amazônia, entre elas a *E. patrisii* mostrou que no extrato foliar tem compostos fenólicos e flavonóides, sendo avaliados através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu e usando o cromogênio p-dimetilaminocinamaldeído respectivamente. (Silva et al., 2007). Essas classes de metabólitos são frequentemente procurados em prospecção fitoquímica por serem compostos de interesse farmacológico com potencial anticâncer e antioxidante.

No trabalho de Rummun e colaboradores (2019), a espécie *Eugenia tinifolia* apresentou alto teor fenólico total, baixo teores de flavanóides totais e baixo teor de proantocianidina (polifenóis), além de atividade antioxidante. As plantas do gênero possuem diferentes níveis de flavonóides, compostos fenólicos e outros, por isso a análise fitoquímica das diferentes espécies é de extrema importância para o desenvolvimento de novos produtos.

Procházkova e colaboradores (2011) mostraram que flavonóides possuem elevado potencial antioxidante devidos aos grupos fenóis ligados a sua estrutura. Isso permite que promovam a inibição direta de radicais livres (reduzindo) tornando-os estáveis. Além disso, podem ativar enzimas antioxidantes que inibem a ação deletéria das ERO, além de agirem como quelantes metálicos. O resultado da cromatografia confirmou a presença de flavonóides e compostos fenólicos em abundância nos extratos, principalmente na folha, com atividade antioxidante confirmada pelo DPPH em cromatografia.

4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)

Além da avaliação de atividade antioxidante pela cromatografia, também foi realizado o método de sequestro do radical DPPH. Nesse sistema, foi utilizado o Trolox (análogo da vitamina E) como antioxidante padrão. Foram feitas diversas curvas, uma com o DPPH (6,25 a 400 µg/mL) onde foi avaliado a mudança colorimétrica que ocorre após redução do mesmo, uma curva com um composto padrão (trolox) e uma com o extrato da folha de *E. patrisii*. Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de inibição de radical e estão representados graficamente na Figura 7B.

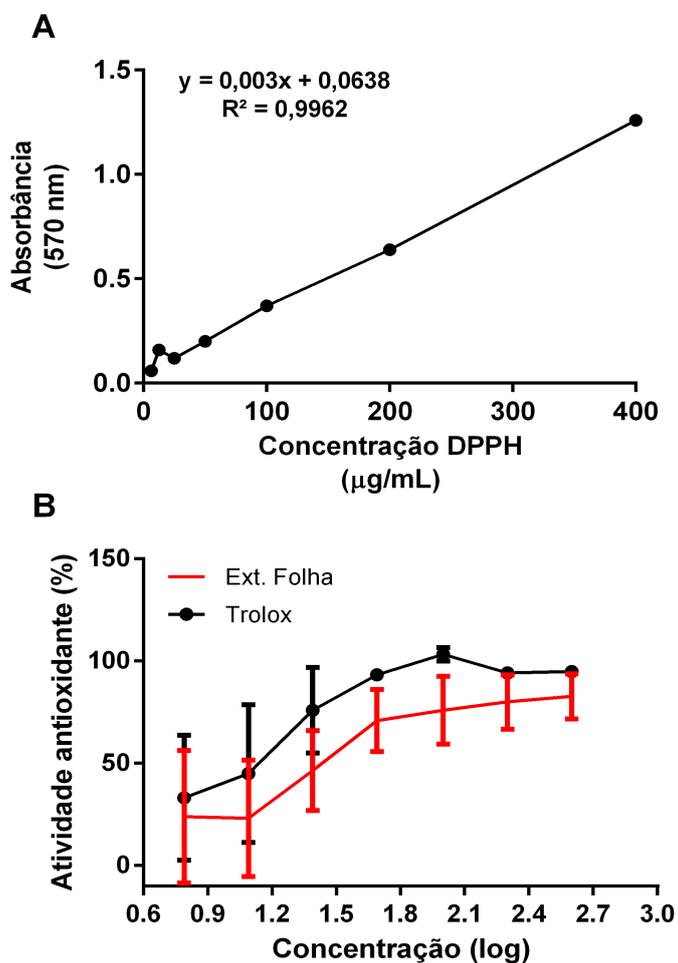


Figura 7. Atividade antioxidante do extrato da folha de *E. patrisii*. **(A)** Curva padrão de DPPH; **(B)** Porcentagem da atividade antioxidante do extrato e do padrão.

O extrato da folha de *E. patrisii* mostrou possuir uma grande atividade antioxidante semelhante ao composto padrão. As curvas de inibição de DPPH tem o mesmo padrão de comportamento, ou seja, ocorre aumento da porcentagem de inibição conforme aumenta a concentração do extrato. O padrão teve uma IC50 a de 13,17 µg/mL enquanto o extrato da folha uma IC50 de 74,79 µg/mL. O nosso extrato teve 82% de eficácia ($p < 0,05$) quando comparado com o padrão. Apesar do extrato da folha possuir menor potência e eficácia do que o padrão ele ainda é considerado um bom antioxidante com valores de IC50 semelhante a outros extratos como os de Jucá (*Libidibia ferrea*) com IC50 de 74,36 µg/mL (Azevedo et al., 2019) e maior que de óleos essenciais de *Eugenia uniflora* (30,3-45,1%) (Figuereido et al., 2019).

Os sesquiterpenos encontrados em óleos essências de *E. patrisii* mostraram atividade antioxidante moderada nos testes de DPPH utilizando Trolox e BHA, com atividade inibitória de sequestro de 40,9% (Silva et al., 2017). O extrato hidroalcoólico da folha em nosso trabalho através do teste do DPPH apresentou uma atividade inibitória maior que os óleos essências (Silva et al., 2017). A utilização do solvente etanol 70% pode ter extraído uma maior quantidade de compostos antioxidantes, assim justificando essa diferença da atividade antioxidante do extrato da folha e dos óleos essências. Silva e colaboradores (2017), também encontraram moderada atividade antioxidante através do ensaio TEAC para o extrato foliar de *E. patrisii*.

4.3 VIABILIDADE CELULAR (REDUÇÃO DE MTT)

Ambos os extratos testados mostraram atividade citotóxica frente todas as linhagens tumorais testadas inibindo mais de 50% das células na linhagens ACP03 e AGP01. As porcentagens de inibição da proliferação celular estão representadas nos gráficos da Figura 6. Entre os extratos, o extrato foliar possui o maior potencial antitumoral, com maior atividade nas linhagens ACP03 e AGP1 (Fig 6B e 6C), além de não reduzir a viabilidade das células normais de VERO nas menores concentrações (7,81 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$) (Fig 6D). Por outro lado, o extrato do caule apesar de também apresentar uma ótima atividade antitumoral, diminuiu significativamente a viabilidade das células normais VERO em todas as concentrações (Fig 7D). A concentração inibitória para 50% de resposta (IC50) nas células normais foi de 320.1 $\mu\text{g/mL}$ e no extrato da folha de 528.1 $\mu\text{g/mL}$ no extrato do caule.

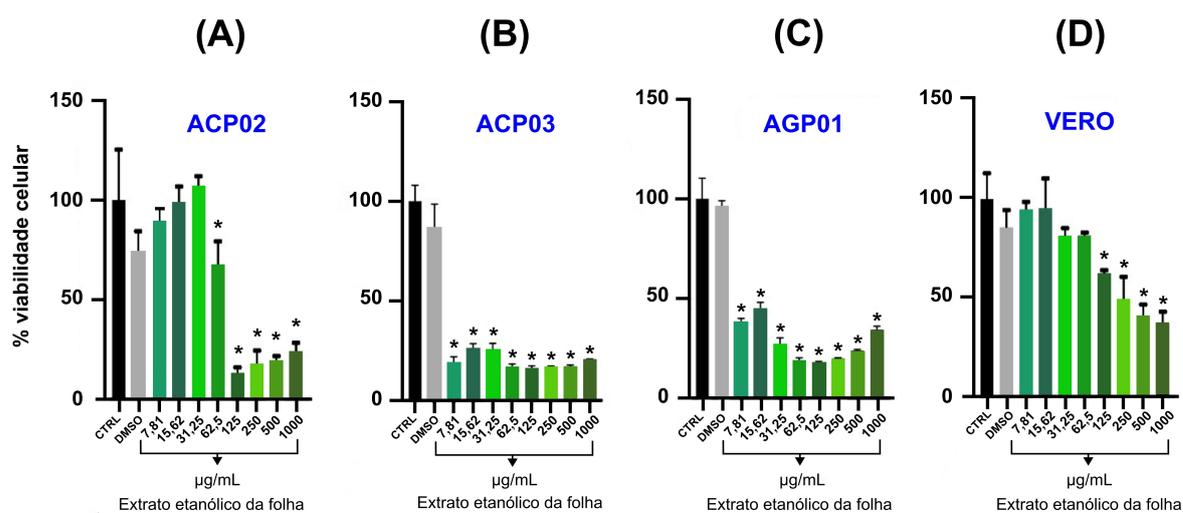


Figura 8. Viabilidade celular das linhagens de câncer ACP02, ACP03, AGP01 e normal VERO após 72h de tratamento com extrato da folha de *E. patrisii*. **(A)** Viabilidade celular na linhagem ACP02; **(B)** Viabilidade celular na linhagem ACP03 **(C)** Viabilidade celular na linhagem AGP01; **(D)** Viabilidade celular na linhagem VERO. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. * Diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

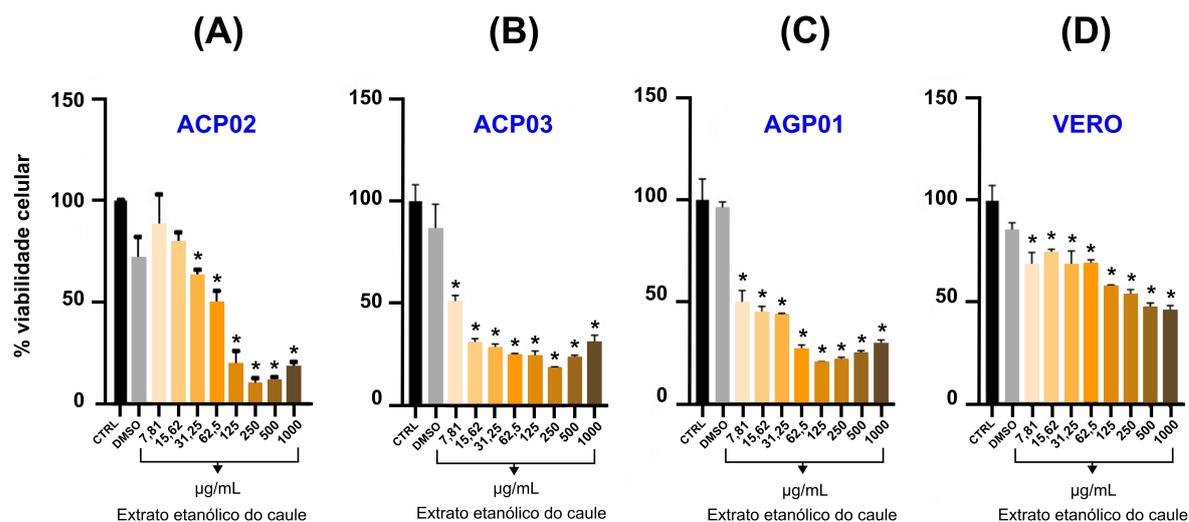


Figura 9. Viabilidade celular das linhagens de câncer ACP02, ACP03, AGP01 e normal VERO após 72h de tratamento com extrato do caule de *E. patrisii*. **(A)** Viabilidade celular na linhagem ACP02. **(B)** Viabilidade celular na linhagem ACP03. **(C)** Viabilidade celular na linhagem AGP01. **(D)** Viabilidade celular na linhagem VERO. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. * Diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Tabela 3. Valores de IC50 e Emáx dos extratos de folha e caule de *E. patrisii*

	IC50 (folha) µg/mL	IC50 (caule) µg/mL	Emáx (folha) µg/mL	Emáx (caule) µg/mL
ACP02	77,02	52,16	125-250 (87%)	125-250 (90%)
ACP03	-	-	62,5-125 (84%)	250-500 (81%)
AGP01	-	-	62,5-125 (82%)	125-250 (80%)
VERO	320,1	528,1	1000 (64%)	1000 (53%)

Legenda: **IC50.** Concentração inibitória de 50% das células. **Emáx.** Efeito máximo, concentração na qual o extrato possui maior inibição da viabilidade celular (%).

Com base nos valores de IC50 e Emáx (Efeito máximo), conseguimos avaliar a potência e a eficácia dos extratos respectivamente. Verificamos que os extratos apresentam uma alta potência nas linhagens ACP03 e AGP01, onde os extratos inibiram a viabilidade de 50% das células, valores iguais de drogas conhecidas como

a doxorrubicina (Azevedo, 2019) . Por outro lado, na linhagem normal as potências foram bem mais baixas, com efeitos nas concentrações de 320,1 e 528,1 $\mu\text{g/mL}$ - na folha e no caule – respectivamente. Esses dados mostram que a potência do extrato é maior nas linhagens cancerígenas do que na linhagem normal, além da eficácia, onde em todas as linhagens de câncer a diminuição da viabilidade foi entre 80 e 90% e já na linhagem normal entre 53 e 64 %. O fracionamento desses extratos brutos pode aumentar a sua potência e eficácia, visto que podem ser testados em menores concentrações. Além disso também pode diminuir sua toxicidade, visto que os compostos que causam baixa da viabilidade celular das células normais podem ser separados dos que tem efeito nas células do câncer gástrico.

Com a viabilidade menor que 50% nas linhagens ACP03 e AGP01 em ambos os extratos (Fig 6B, 6C, 7B e 7C), não foi possível calcular a IC50 - logo sendo esta menor que 7,81 $\mu\text{g/mL}$ - dessa forma necessitando avaliar a viabilidade celular das linhagens expostas aos extratos em tempos de tratamento de 24 ou 48h, para determinar a IC50 usando as mesmas concentrações ou então diminuir as concentrações testadas em 72h. Na linhagem ACP02, os efeitos citotóxicos foram demonstrados a partir da concentração de 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para os extrato da folha e caule respectivamente até a maior concentração estudada. Apesar dos extratos não diminuírem a viabilidade celular nas menores concentrações como nas outras linhagens, foi na ACP02 que foram mais eficazes, inibindo o crescimento celular em torno de 87% na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ no extrato da folha e em torno de 90% na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ no extrato do caule.

MN01

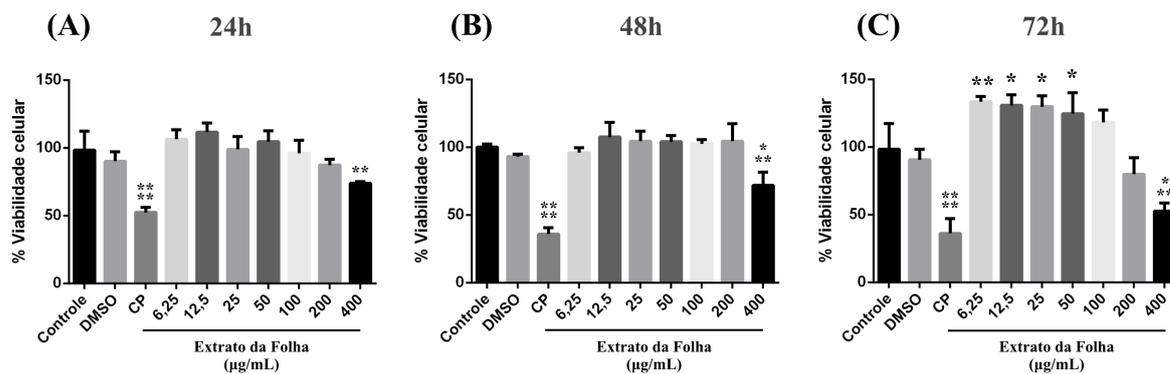


Figura 10. Viabilidade celular da linhagem gástrica normal MN01 após 24h, 48h e 72h de tratamento com extrato da folha de *E. patrisii*. **(A)** Viabilidade celular na linhagem MN01 em 24h de tratamento. **(B)** Viabilidade celular na linhagem MN01 em 48h de tratamento. **(C)** Viabilidade celular na linhagem MN01 em 72h de tratamento. **CP.** Controle positivo: doxorrubicina (200 µg/ mL). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença estatística em relação ao grupo controle *($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

A viabilidade da linhagem gástrica normal não apresentou diminuição significativa quando comparada ao grupo controle em todos os tempos de tratamento, exceto na concentração de 400 µg/mL. No tempo de tratamento de 72h as concentrações no intervalo de 6,25 a 50 µg/mL apresentaram aumento significativo da viabilidade celular. Em todos os tratamentos, a MN01 apresentou diminuição da viabilidade celular no grupo controle positivo tratado com doxorrubicina ($p < 0,0001$). A IC50 para o grupo de 72h foi de 402,3, para o grupo de 48h foi de 418,4 e IC50 superior a 500 µg/mL no grupo de 24h nas concentrações estudadas.

No trabalho de Da Silva e colaboradores (2017), onde testaram a citotoxicidade de seis óleos essenciais de *Eugenia sp.*, a viabilidade nas linhagens HCT116 (Cólon) e MRC5 (Fibroblasto humano) foi reduzida significativamente quando tratadas com os óleos de *E. patrisii* com IC50 de 16,4 µg/mL e 18,1 µg/mL, respectivamente. Por outro lado nas linhagens AGP01 (gástrico), SKMEL19 (Melanoma) não apresentaram nenhuma redução significativa da viabilidade celular, com IC50 sendo maior que 25 µg/mL. Além disso, os óleos essenciais das outras

espécies estudadas *E. egensis*, *E. flavescens*, *E. polytachya* também não tiveram redução significativa da viabilidade celular na linhagem AGP01. Diferente do encontrando em nosso trabalho onde o extrato da folha reduziu a viabilidade até na menor concentração 7,81 µg/mL, indicando que os composto responsável pela diminuição da viabilidade das células de câncer gástrico possa ser diferente dos encontrados nos óleos ou até mesmo em maior quantidade em nosso extrato.

O extrato de *Eugenia tinifolia* apresentou citotoxicidade nas linhagens celulares cancerígenas de FLO-1 (adenocarcinoma de esôfago), HeLa (adenocarcinoma cervical), HCT116 (carcinoma colorretal), e normal de FIBR (fibroblasto) e RPE1 (pigmento de retina) com IC50 de 45,72, 35,26, 19,54 e 38,94 µg/mL, respectivamente. Além disso o extrato de *E. tinifolia* foi menos tóxico que o quimioterápico (etoposídeo) nas células de câncer (Rummun et al. 2019). Assim como no trabalho de Rummun et al. (2019), o extrato do caule de *E. patrisii* também reduziu a viabilidade das células normais VERO, contudo, por se tratar de um extrato bruto, suas frações ainda podem ser testadas para atividade antitumoral, visto que a redução das linhagens ACP03 e AGP01 foram significantes e que as frações podem possuir menos compostos que prejudicam a célula normal.

Um *screening* de extratos etanólicos de diversas plantas, incluindo a espécie *Eugenia aquea*, foi feito através do ensaio do MTT na linhagem MCF7 (adenocarcinoma de mama) e mostrou que a espécie *E. aquea* possui efeito antitumoral significativo, com IC50 de 58 µg/mL. Apartir desses dados, o extrato bruto foi fracionado e uma fração de n-hexano da *E. aquea* diminui mais ainda a IC50 para 24 µg/mL, sendo portanto a fração muito mais eficaz na diminuição da viabilidade celular do que o extrato bruto (Subarnas et al., 2012).

4.4 ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE MMP-2 E MMP-9 (ZIMOGRAFIA)

As atividades da MMP-2 e MMP-9 foram avaliadas por zimografia em gel (figura 11A). Os géis foram incubados com extrato da folha de *Eugenia patrisii* Vahl nas concentrações de 6,25µg/ml e de 50µg/ml e a atividade gelatinolítica da matriz extracelular 2 e 9 foram comparadas ao controle incubada com Tris CaCl₂. (figura 11B e 11C). O extrato diminuiu consideravelmente a atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9 na concentração de 50µg/ml ($p < 0,05$). Apesar da concentração de 6,25µg/ml não ter tido diferença significativa na inibição de ambas MMPs, essa concentração ainda diminuiu a atividade da MMP-9. Podemos observar que a inibição da MMP-9 ($p < 0,001$) foi maior que a da MMP-2 ($p < 0,05$) quando comparamos os grupos tratados com 50µg/ml do extrato da folha de *E. patrisii*.

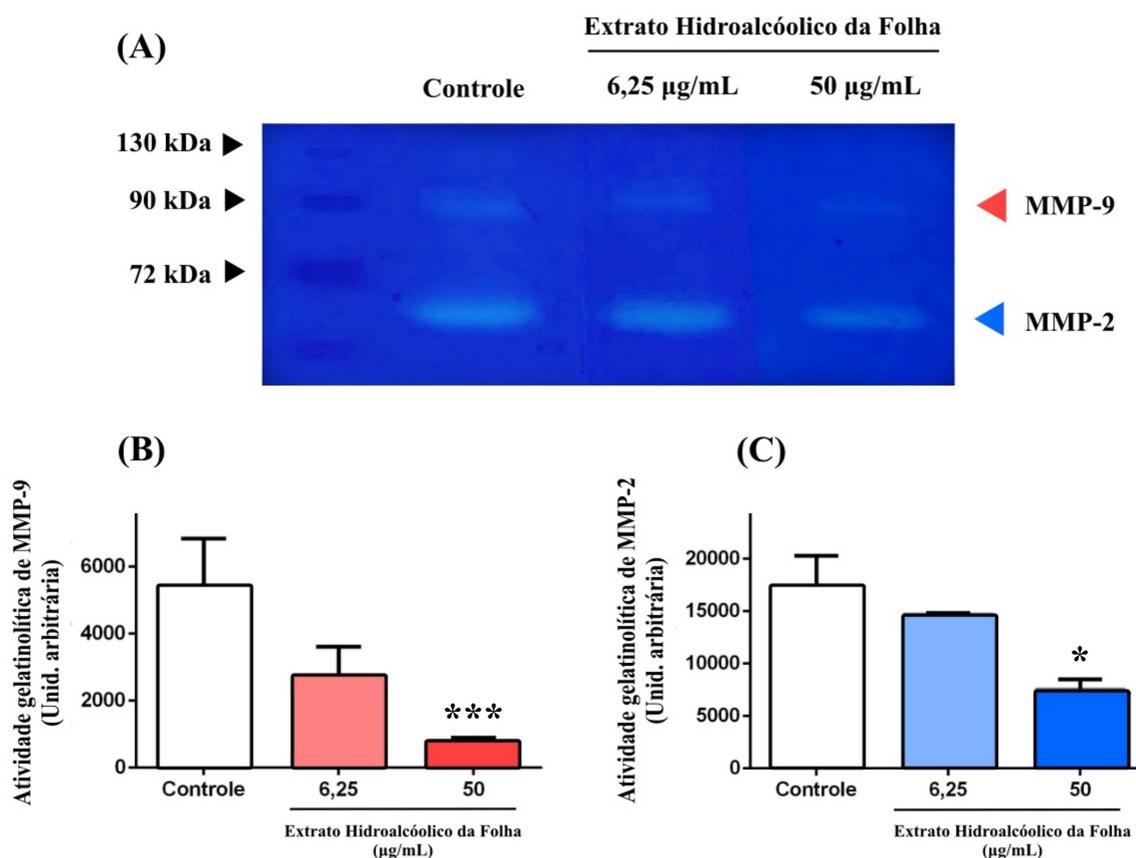


Figura 11. Atividade inibitória do extrato da folha de *E. patrisii* sobre a MMP-2 e MMP-9 em gel de zimografia. (A) Figura representativa de zimograma mostrando: padrão com as bandas de 130 kDa, 90 kDa, 72 kDa; grupo controle (Tris CaCl₂); grupo tratado com extrato da folha a 6,25µg/ml; grupo tratado com extrato a 50µg/ml. (B) Gráfico da atividade gelatinolítica da MMP-9 (C) Gráfico da atividade da MMP-2. Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. Diferença estatística em relação ao grupo controle * ($p < 0,05$), *** ($p < 0,001$).

No câncer gástrico as MMP-2 e MMP-9 estão mais expressas em pacientes com *Helicobacter pylori*. A MMP-9 é amplamente relatada no câncer gástrico e diversos estudos corroboram o seu envolvimento na carcinogênese gástrica (Costa et al., 2016, Oliveira et al., 2006). Essas MMPs induzem o remodelamento da ECM e facilitam a invasão de tecidos adjacentes causando metástases (Lee et al., 2008; Soleyman et al., 2014).

A MMP-2 está relacionada ao desprendimento de células cancerosas da parede gástrica (McDonnell et al., 1991), assim como a profundidade da invasão, metástases em linfonodos e metástases distantes do câncer gástrico (Monig et al., 2001). Alguns estudos de meta-análise (Chen et al., 2014; Shen et al., 2014) mostraram que a superexpressão de MMPs, principalmente a MMP-2, MMP-7 e MMP-9, estão associadas a um pior prognóstico em pacientes com câncer gástrico.

A diminuição das atividades das MMPs pode ser acontecido através de uma atividade quelante sobre os ions zinco e cálcio que são fundamentais para as atividades das MMPs (NAGASE et al., 2006). Na técnica de zimografia em gel, utiliza-se o tampão triscloroeto CaCl_2 10 mM no qual os extratos ficaram incubados por 18 horas. Portanto se os extratos quelarem o cálcio ou o zinco presente no sítio catalítico das MMPs as atividades das mesma diminui, explicando os resultados obtidos na zimografia. Uma limitação no nosso estudo foi que não avaliamos as MMP-2 e MMP-9 e a migração celular nas células tumorais após incubação com o extrato da folha. Isso poderia nos mostrar se o extrato consegue inibir as MMPs e se isso está relacionado com a diminuição da migração celular.

A produção de MMPs também é estimulada por fatores como o estresse oxidativo, que levam à sua regulação positiva com subsequente remodelação da MEC. Ainda, o estresse oxidativo induzido pelo desequilíbrio entre a eliminação e a produção de ERO tem efeito deletério na biologia vascular via ativação excessiva de MMPs (Martinez et al. 2011). Compostos com atividades antioxidantes que contribuam para o equilíbrio de ERO e que diminuam a atividade das MMPs são importantes para evitar o aparecimento do câncer e formação de matástases. O extrato da folha de *E. patrisii* mostrou possuir compostos que podem atuar nessas vias por apresentar um ótimo potencial antioxidante assim como diminuiu as atividades das MMP-2 e MMP-9.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos os extratos da folha e do caule de *E. patrisii* Vahl possuem terpenos, flavonoides e composto fenólicos, com uma boa capacidade antioxidante, com a folha apresentando maior atividade antioxidante. Ambos extratos mostraram possuir atividade antitumoral, visto que diminuíram a viabilidade celular das linhagens gástricas AGP01, ACP02 e ACP03 ao mesmo tempo em que o extrato da folha não diminuiu a viabilidade de células gástricas normais (MN01). Além disso, o extrato da folha também diminuiu a atividade das MMP-2 e MMP-9 principais responsáveis por remodelamento da matriz extracelular e por causar metástases nos processos carcinogênicos. Os extratos possuem terpenos, flavonóides e outros compostos fenólicos com potencial para isolamento de substâncias que podem ser transformados em fármacos no combate ao câncer gástrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOTALEB, M., SAMUEL, S. M., VARGHESE, E., VARGHESE, S., KUBATKA, P., LISKOVA, A., & BÜSSELBERG, D. Flavonoids in cancer and apoptosis. **Cancers**, 11(1), 28. 2019.

ALBERT B. *Biologia Molecular da Célula*, 6. ed. – Porto Alegre: Artmed 2017. ISBN 978-85-8271-422-5

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; PETER, W. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª edição. Porto Alegre, RS: Artmed 2010.

ALICANDRO, G. et al. Educational inequality in cancer mortality: a record linkage study of over 35 million Italians. **Cancer Causes Control**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 997-1006, 2017.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. (2005) Câncer e agentes antineoplásicos, ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim Nova** 28: 118-129.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Stomach cancer risk factors. **Causes, risk and prevention**, 2017. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>>. Acesso em: 20 de outubro de 2019.

ANAND, P., A. B. KUNNUMAKKARA, C. SUNDARAM, K. B. HARIKUMAR, S. T. THARAKAN, O. S. LAI, B. SUNG; B. B. AGGARWAL "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes." **Pharmaceutical Research**, v. 25 p.2097-2116. 2008

ANDERSON, W.A.D.; JOHNM, M.D.K. *Patologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p.73-81.

ARORA, Amit; SCHOLAR, Eric M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 3, p. 971-979, 2005.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**. v. 89, p. 27-36, 2005.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASTOS, M.N.C. Levantamento florístico em restinga arenosa litorânea na Ilha de Maiandeuá, Pará, Brasil. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, **Sér. Bot.**, 4: 159-173, 1988.

CALANDRINI DE AZEVEDO, Luana França et al. Aqueous ethanol extract of *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul) LP Queiroz (juca) exhibits antioxidant and migration-inhibiting activity in human gastric adenocarcinoma (ACP02) cells. **Plos one**, v. 15, n. 1, p. e0226979, 2020.

CARNEIRO, N. S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 89(3), 1907-1915, 2017.

CAROCHO, M.; & FERREIRA, I. The role of phenolic compounds in the fight against cancer—a review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry** (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 13(8), 1236-1258. 2013.

CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis da Amazonia. 4. ed. rev. e ampl. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1988.

CERCHIARO D.C.S.G. & HONÓRIO K.M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

CHAIEB K. et al. The Chemical Composition and Biological Activity of Clove Essential Oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A Short Review. **Phytother. Res.** 21, 501–506, (2007).

CHEN, J. et al. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer: A meta-analysis. **Hepatogastroenterology**. 61, 518–524. 2014

CHEN, S.Z.; YAO, H.Q.; ZHU, S.Z.; LI, Q.Y.; GUO, G.H.; YU, J. Expression levels of matrix metalloproteinase-9 in human gastric carcinoma. **Oncol. Lett.** 9, 915–919. 2015.

COMINETTI C. et al. Considerações sobre estresse oxidativo, selênio e nutrigênica. Nutrire: **Revista Sociedade Brasileira Alimentos Nutrição**, v. 36, n. 3, p. 131-153, 2011.

COSTA-LOTUFO, Leticia V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COSTA, A.M. et al. Helicobacter pylori Activates Matrix Metalloproteinase 10 in Gastric Epithelial Cells via EGFR and ERK-mediated Pathways. **J. Infect. Dis.** 213, 1767–1776. 2016.

DA SILVA, J., ANDRADE, E., BARRETO, L., DA SILVA, N., RIBEIRO, A., MONTENEGRO, R., & MAIA, J.. Chemical composition of four essential oils of Eugenia from the Brazilian Amazon and their cytotoxic and antioxidant activity. **Medicines**, 4(3), 51, 2017.

DE ARAÚJO, F. F et al. Wild Brazilian species of Eugenia genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food research international**, 2019.

DIACONU, S. et al. Helicobacter pylori infection: old and new. **Journal of Medicine and Life**, Bucharest, v. 10, n. 2, p. 112-117, 2017.

DIPLOCK AT et al. Functional food science and defence against reactive oxidative. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 77112, 1998.

DOS SANTOS, J. F. S. et al. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the Eugenia uniflora essential oil against Candida spp. **Food chemistry**, 261, 233-239, 2018.

E-JARDIM. Eugenia patrisii / ubaia-rubi-da-amazônia. **Frutíferas**. Disponível em: <http://www.e-jardim.com/produto_completo.asp?IDProduto=115>. Acessado em 15 de novembro de 2019.

FAIRBAIRN, D.W. et al. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res.** v.339, p. 37-59, 1995.

FIGUEIREDO, Pablo Luis B. et al. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of Eugenia uniflora L. chemotype-oils from the Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 232, p. 30-38, 2019.

FONSECA, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor**, Viçosa, 2012.

FOTAKIS, G., TIMBRELL, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, vermelho neutro, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**. V. 160, p.171-77, 2006.

GIACON, G. Ubaia rubi ou princesinha do amazonas. **Viveiro Ciprest – Plantas Nativas e Exóticas**. 2017. Disponível em <<http://bit.ly/fotoubaia>>. Acessado em 20 de março de 2019.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY (GBIF). *Eugenia patrisii Vahl Taxonomy*. Disponível em <<https://www.gbif.org/pt/species/5417187>>. Acessado em 28 de junho de 2020.

GUPTA S.C.; HEVIA D.; PATCHVA S.; PARK B.; KOH W.; AGGARWAL B.B. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 11, p. 1089-2011, 2012

HARTGRINK, H.H. et al. **Gastric cancer. Lancet**. 374, 477–490. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA, 2017. ISBN 978-85-7318-361-0 (versão eletrônica).

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA, 2019. ISBN 978-85-7318-389-4 (versão eletrônica).

JAFARI, S., SAEIDNIA, S., & ABDOLLAHI, M. Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle. **Current pharmaceutical biotechnology**, 15(4), 409-421. 2014.

JAYAKUMAR, T.; THOMAS, P.A.; GERALDINE, P. In vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 228- 234, 2009.

LAUREN P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. **Acta Pathol Microbiol Scand**. 1965;64:31–49.

LEAL, M. F. et al. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer genetics and cytogenetics**, 195(1), 85-91, 2009.

LEE, L.Y. et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer and their relation to claudin-4 expression. **Histol. Histopathol**. 23, 515–521. 2008.

LIMBERGER *RP et al*. Biological activities and essential oil composition of leaves of *Blepharocalyx salicifolius*. **Pharm Biol** 39: 308-311. (2001)

MA, X., WANG, Z. Anticancer drug discovery in the future: an evolutionary perspective. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 23/24, p. 1136-42, 2009.

MADAME DAS FRUTAS. Ubaia. Plataforma de compartilhamentos de vídeos youtube. 2019. Disponível em <https://youtu.be/5Nb_DxmMDtc>. Acesso em 15 de maio de 2019.

MARTINEZ-LEMUS, Luis A. et al. In ward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygens pecies-dependent activation of matrix metalloproteinases. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 300, n. 6, p. H2005-H2015, 2011.

MATOS, F.J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

MAUÉS, L. A. L. et al. Flavonoids from the Amazon plant *Brosimum acutifolium* induce C6 glioma cell line apoptosis by disrupting mitochondrial membrane potential and reducing AKT phosphorylation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 113, 108728. 2019.

MCDONNELL, S., NAVRE, M., COFFEY JR., R.J., MATRISIAN, L.M. Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas. **Mol. Carcinog.** 4, 527–533. 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes diagnósticas e terapêuticas – Adenocarcinoma gástrico. **Portaria Conjunta nº 03, de 15 de janeiro de 2018**. p.4-4, 2018.

MIRANDA, G.S. et al. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes gradações alcoólicas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.15, n.1, p.104-111, 2013.

MONIG, S.P. et al. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. **Histopathology**, 39, 597–602. 2001.

MONTANARI, Carlos Alberto; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, p. 105-111, 2001.

NABESHIMA K, INOUE T, SHIMAO Y, SAMESHIMA T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. **Pathol Int** 52:255-64, 2002.

NAGASE; H., VISSE. R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res.** v. 69, p. 562–573, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE AT THE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Gastric Cancer Treatment (PDQ®) – Health Professional Version. 2017. Disponível em <<https://www.cancer.gov/types/stomach/hp/stomach-treatment-pdq>>. Acesso em 20 de setembro de 2019.

NOVAES G.M.; SILVA M.J.D.; ACHKAR, M.T.; VILEGAS, W. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 535-539, 2014.

OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OLIVEIRA, M.J. et al. Helicobacter pylori induces gastric epithelial cell invasion in a c-Met and type IV secretion system-dependent manner. **J. Biol. Chem.** 281, 34888–34896. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global Cancer Observatory (Globocan). 2018. Disponível em <<http://gco.iarc.fr/>>. Acessado em 10 de Novembro de 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Folha informativa do câncer. 2018. Disponível em <<http://abre.ai/opas2018>>. Acessado 12 de novembro de 2019.

OVERALL CM, LOPEZ-OTIN C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. **Nat Rev Cancer**. p. 2:657-72, 2002.

PAULA J.A.M., REIS J.B., FERREIRA L.H.M., MENEZES A.C.S. AND PAULA JR. . Gênero Pimenta: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Rev Bras PI Med** 12: 363-379, 2010.

PAULA, Joelma A.M. et al. Estudo farmacognóstico das folhas de Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) LR Landrum–Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 265-278, 2008.

PROCHAZKOVA, D., BOUŠOVA, I., WILHELMOVA, N., Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoter**. 82, 513–523, 2011.

RAKOFF-NAHOUM, S. "Why cancer and inflammation?" **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v.79 p.123-130. 2006.

RAMPERSAD, S.N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors** v. 12, p. 12347-12360, 2012.

RAVISHANKAR D., RAJORA A.K., GRECO F., OSBORN H.M.I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013;45:2821–2831.

REQUES, L. et al. Educational differences in mortality and the relative importance of different causes of death: a 7-year follow-up study of Spanish adults. **Journal of Epidemiology and Community Health**, London, v. 68, n. 12, p. 1151-1160, 2014.

RESENDE A.L.S., MATTOS I.E., KOIFMAN S. Dieta e câncer gástrico: aspectos históricos associados ao padrão de consumo alimentar no Estado do Pará. **Revista de Nutrição**. Campinas, 19: 511-9. 2006.

ROCHA, C.A.M. Produtos naturais com atividade antitumoral. **As pernas do Caranguejo: cancer crura**, Belém: 1º ed., p.93-94, 2013.

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrientes: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, p. 693-702, 1996.

ROSÁRIO, A. S. D. et al. Flórua fanerogâmica das restingas do estado do Pará. Ilhas de Algodoal e Maiandeuá-2. Myrtaceae AL de Jussieu. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, série Ciências Naturais, Belém, v. 1, n. 3, p. 31-48. 2005.

RUMMUN, N. et al.. Mauritian Endemic Medicinal Plant Extracts Induce G2/M Phase Cell Cycle Arrest and Growth Inhibition of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma in Vitro. **Acta naturae**, 11(1), 81, 2019.

RYDLOVA M, HOLUBEC L JR, LUDVIKOVA M JR, KALFERT D, FRANEKOVA J, POVYSIL C. et al. Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. **Anticancer Res**. p. 28:1389-97, 2008

SAEED, M. E.; ABDELGADIR, H.; SUGIMOTO, Y.; KHALID, H. E.; EFFERTH, T. Cytotoxicity of 35 medicinal plants from Sudan towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 644-58, 2015.

SALVADOR, M. J., DE LOURENÇO, C. C., ANDREAZZA, N. L., PASCOAL, A. C., & STEFANELLO, M. É. A. Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. **Natural product communications**, 6(7), 2011. SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos um importante alvo no combate ao câncer. **Quim. Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SHEN, W.; XI, H.; WEI, B.; CHEN, L. The prognostic role of matrix metalloproteinase 2 in gastric cancer: A systematic review with meta-analysis. **J. Cancer Res. Clin. Oncol**. 140, 1003–1009. 2014.

SILVA, E. M., SOUZA, J. N. S., ROGEZ, H., REES, J. F., & LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, 101(3), 1012-1018, 2007.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SNUSTAD, D. P. & SIMOONS, M. J. Fundamentos da Genética. 7. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. ISBN 978-85-277-3086-0.

SOLEYMAN-JAHI, S. et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 in gastric cancer survival: A meta-analysis. **PLoS ONE**. 2014

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report**: 2014. Lyon: IARC, 2014.

SUBARNAS, A. et al. Antiproliferative activity of primates-consumed plants against MCF-7 human breast cancer cell lines. **E3 J Med Res**, 1, 38-43, 2012.

SUN, T.; HO, C. T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**. v. 90, p. 743-749, 2005.

TOUYZ, Rhian M. et al. Vascular biology of superoxide-generating NADPH oxidase 5—Implications in hypertension and cardiovascular disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 30, n. 7, p. 1027-1040, 2019.

VELLOSA, José C.R. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 4, n. 2, 2007.

VICENTINO, A. R., & MENEZES, F. D. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Rev Bras Farmacogn**, 17(3), 384-7, 2007.

VILLELA, I.V. et al. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (Org) **Genética Toxicológica**. Porto Alegre, RS: Alcance, p.147-163, 2003.

WAGNER, H.; BLADIT, S. Plant Drugs Analysis: A Thin Layer Chromatography. **Atlas Springer Verlag**. 2001.

WOESSNER, J.F. & JR, NAGASE H. Functions of the TIMPs. In: Matrix Metalloproteinases and TIMPs. New York, NY: **Oxford University Press**. p. 130-5, 2000.

YILDRIN, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4083-4089, 2001.