

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**INSTITUTO DE SAÚDE DE NOVA FRIBURGO**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**

**LUIZA ERTHAL AMORIN**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS DE *Solidago*  
*Microglossa* EM CÉLULAS DE CARCINOMA CERVICAL HeLa**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ANÁLISES CLÍNICAS**

**NOVA FRIBURGO**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**INSTITUTO DE SAÚDE DE NOVA FRIBURGO**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**

LUIZA ERTHAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS DE *Solidago*  
*Microglossa* EM CÉLULAS DE CARCINOMA CERVICAL HeLa**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biomedicina, para obtenção do título de Bacharel, com enfoque na área de Análises Clínicas, apresentada a Universidade Federal Fluminense/ Instituto de Saúde de Nova Friburgo.

Orientadora: profa. Dra. Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal  
Co-orientadora: Ms. Mariana Toledo Martins Pereira

**NOVA FRIBURGO**

**2019**

Ficha catalográfica automática - SDC/BNF  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

E65a Erthal, Luiza  
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS DE  
Solidago Microglossa EM CÉLULAS DE CARCINOMA CERVICAL HeLa /  
Luiza Erthal, Aislán Cristina Rhader Fagundes Pascoal, Mariana  
Toledo Martins Pereira ; Aislán Cristina Rhader Fagundes  
Pascoal, orientadora ; Mariana Toledo Martins Pereira,  
coorientadora. Nova Friburgo, 2019.  
28 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)-  
Universidade Federal Fluminense, Instituto de Saúde de Nova  
Friburgo, Nova Friburgo, 2019.

1. Câncer. 2. Produtos Naturais. 3. Asteraceae , Plantas  
medicinais. 4. HPV. 5. Produção intelectual. I. Pascoal,  
Aislán Cristina Rhader Fagundes. II. Pereira, Mariana Toledo  
Martins. III. Cristina Rhader Fagundes Pascoal, Aislán,  
orientadora. IV. Toledo Martins Pereira, Mariana,  
coorientadora. V. Universidade Federal Fluminense. Instituto  
de Saúde de Nova Friburgo. VI. Título.

CDD -

Bibliotecária responsável: Natália Ribeiro de Rezende - CRB7/6422

LUIZA ERTHAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS DE *Solidago  
Microglossa* EM CÉLULAS DE CARCINOMA CERVICAL HeLa**

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019

BANCA EXAMINADORA:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aislan Cristina Rheder Fagundes Pascoal – Departamento de Ciências Básicas- ISNF

Ms Kelly Costa de Almeida – Programa de Pós-graduação em Ciências e Biotecnologia da UFF

Prof. Dr. Leonardo de Souza Mendonça – Departamento de Ciências Básicas - ISNF

*Dedico este trabalho primeiramente à minha grande mãe Maria Eugênia Erthal: uma grande lutadora e verdadeira encarnação da determinação, esforço e dedicação à família. Mãe, este TCC jamais seria possível sem o seu valioso e incessante trabalho de nos educar, orientar e encorajar nos bons e nos maus momentos. Muito obrigada!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a minha mãe, que nunca me desamparou, sempre zelou por mim e me forneceu muito amor e carinho.

Aos meus irmãos, primos e tios que de uma forma ou de outra nos auxiliaram ou nos socorreram.

Ao professor Nestor Norio Owia, por compreender as minhas limitações na área de Exatas e ser um dos grandes responsáveis por eu estar aqui agora.

À professora Aislan, sempre gentil e paciente, por ter aceitado me orientar neste trabalho.

Ao pessoal da biblioteca do ISNF, sempre tão atenciosos, generosos e simpáticos.

À todos que me emprestaram anotações para que eu pudesse copiar quando precisasse.

Aos amigos do Laboratório Multiusuário de Pesquisa Biomédica, em especial meus colegas Júlio (responsável por cultivar as células) e Mariana (minha coorientadora).

Ao prof. Vinícius, uma das pessoas que me auxiliou neste projeto.

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| <b><u>LISTA DE ABREVIATURAS</u></b> .....  | 8  |
| <b><u>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</u></b> .....   | 8  |
| <b><u>RESUMO</u></b> .....   | 9  |
| <b><u>ABSTRACT</u></b> .....   | 10 |
| <b><u>1. INTRODUÇÃO:</u></b> .....   | 11 |
| <b><u>2. REVISÃO LITERÁRIA:</u></b> .....  | 14 |
| <b><u>2.1. O HPV, o câncer cervical e o tratamento:</u></b> .....                | 14 |
| <b><u>2.2. Busca por novos compostos em produtos naturais:</u></b> .....         | 16 |
| <b><u>2.3. Família Asteraceae e o Gênero <i>Solidago</i>:</u></b> .....          | 18 |
| <b><u>3. OBJETIVOS:</u></b> .....  | 20 |
| <b><u>3.1. Objetivo Geral</u></b> .....  | 20 |
| <b><u>4. MATERIAIS E MÉTODOS:</u></b> .....                                      | 20 |
| <b><u>4.1. Coleta e Preparo dos Extratos:</u></b> .....                          | 20 |
| <b><u>4.2. Avaliação da Atividade Antiproliferativa:</u></b> .....               | 20 |
| <b><u>4.3. Quantificação de compostos fenólicos totais:</u></b> .....            | 21 |
| <b><u>4.4 Quantificação de Flavonoides Totais:</u></b> .....                     | 21 |
| <b><u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:</u></b> .....                                   | 22 |
| <b><u>5.1. Atividade Antiproliferativa/Quantificação de Compostos:</u></b> ..... | 22 |
| <b><u>6. CONCLUSÃO:</u></b> .....  | 26 |
| <b><u>7. PERSPECTIVAS FUTURAS:</u></b> .....                                     | 26 |
| <b><u>8. REFERÊNCIAS</u></b> .....   | 26 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                  |       |   |
|------------------|-------|---|
| AAS              | ----- | ácido acetilsalicílico                                      |
| AGE              | ----- | ácido gálico equivalente                                    |
| CC               | ----- | Câncer cervical   |
| CIM              | ----- | concentração inibitória mínima                              |
| CO <sub>2</sub>  | ----- | Dióxido de carbono  |
| DMSO             | ----- | Dimetilsulfoxido  |
| DNA              | ----- | ácido desoxirribonucleico                                   |
| HPV              | ----- | Papiloma Vírus Humano                                       |
| IC <sub>50</sub> | ----- | metade da concentração inibitória máxima                    |
| MTT              | ----- | 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium       |
| PCR              | ----- | Reação em cadeia da polimerase                              |
| PV               | ----- | Papilomavirus   |
| RQT              | ----- | Radioquimioterapia  |
| RTOG             | ----- | Radiation Therapy Oncology Group                            |
| SFA              | ----- | Fração Acetato de Etila das folhas de <i>S. microglossa</i> |
| SFE              | ----- | Extrato Etanólico das folhas de <i>S. microglossa</i>       |



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** *Solidago microglossa* ----- página 13
- Figura 2:** Estrutura química da aspirina, derivada do ácido salicílico ----- página 17
- Figura 3:** Estrutura básica da família Asteraceae ----- página 19
- Figura 4:** Viabilidade celular no ensaio MTT após o tratamento com SFA ----- página 22
- Figura 5:** Viabilidade celular no ensaio MTT após o tratamento com SFE ----- página 23
- Figura 6:** Estrutura química de compostos identificados em *S. microglossa* ----- página 25

## RESUMO

O Câncer Cervical (CC) é o terceiro tipo de câncer mais prevalente no mundo e sua base etiológica central é a infecção persistente do colo uterino pelo vírus HPV. São mais de 40 tipos que podem infectar células do trato ano-genital, 13 são considerados oncogênicos e entre eles, os subtipos 16 e 18 estão associados a 70% dos casos de câncer de colo de útero. A maioria das infecções por HPV regride espontaneamente em até 2 anos, porém a infecção persistente, se não tratada, pode progredir para lesões pré-malignas e ao câncer cervical. O tratamento para o câncer cervical é cirúrgico, quimioterapia e radioterapia. Os quimioterápicos utilizados para o tratamento desta neoplasia são Carboplatina, Cisplatina, Paclitaxel e Vinorelbina. Algumas vezes, estes medicamentos podem não levar há uma remissão das células tumorais, como também apresentam inúmeros efeitos colaterais. Assim, diante deste cenário, faz-se necessária a busca de novos compostos com atividade antitumoral efetiva em carcinoma cervical, com menos efeitos colaterais. *Solidago microglossa* é um vegetal pertencente à família Asteraceae, sendo nativa da América do Sul. Suas folhas possuem propriedades adstringentes, cicatrizantes, anti-inflamatórias e antimicrobiana. Este trabalho teve, como objetivo principal, avaliar a atividade antiproliferativa de extratos de *S. microglossa* em células de carcinoma cervical HeLa pelo ensaio de MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), assim como a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais. Nos resultados pode-se observar que *S. microglossa* apresenta atividade antiproliferativa em células de carcinoma cervical, assim como a presença de compostos fenólicos e flavonoides. O extrato etanólico (SFE) apresentou IC<sub>50</sub> de 58,64 µg/ml, já a fração acetato de etila (SFA) teve o IC<sub>50</sub> de 38,15 µg/ml

**Palavras – chaves:** *Solidago microglossa*, câncer cervical, fitoterapia, atividade antiproliferativa

## ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the third most prevalent type of cancer in the world and its central etiological basis is the persistent infection of the cervix by the HPV virus. There are more than 40 types that can infect anogenital tract cells, 13 are considered oncogenic and among them, subtypes 16 and 18 are associated with 70% of cervical cancer cases. Most HPV infections resolve spontaneously within 2 years, but persistent infection, if left untreated, can progress to premalignant lesions and cervical cancer. The treatment for cervical cancer is surgical, chemotherapy and radiotherapy. The chemotherapeutic agents used to treat this neoplasia are carboplatin, cisplatin, paclitaxel and vinorelbine. Sometimes these medications may not lead to tumor cell remission, as they also have numerous side effects. Thus, in view of this scenario, it is necessary to search for new compounds with effective antitumor activity in cervical carcinoma, with fewer side effects. *Solidago microglossa* is a plant belonging to the Asteraceae family, native to South America. Its leaves have astringent, healing, anti-inflammatory and antimicrobial properties. The main objective of this study was to evaluate the antiproliferative activity of *S. microglossa* extracts in HeLa cervical carcinoma cells by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay), as well as the quantification of phenolic compounds and total flavonoids. In the results it can be observed that *S. microglossa* presents antiproliferative activity in cervical carcinoma cells, as well as the presence of phenolic and flavonoid compounds. The ethanolic extract (SFE) had an IC<sub>50</sub> of 58.64 µg/ml, while the ethyl acetate fraction (SFA) had an IC<sub>50</sub> of 38.15 µg/ml.

**Keywords:** *Solidago microglossa*, cervical cancer, herbal medicine, antiproliferative activity

## 1. INTRODUÇÃO:

O câncer cervical também conhecido como câncer de colo do útero, é causado pela infecção persistente por certas cepas oncogênicas do Papilomavírus humano (HPV), que se instalam na região genital. A infecção por esse vírus é muito comum e, na maioria das vezes, não leva ao desenvolvimento da patologia. Porém, em determinados casos, o esmo pode causar alterações epiteliais (verrugas/papilomas) que podem evoluir para um tumor maligno. Este é o 3º tipo de câncer mais comum entre mulheres, e a 4ª causa de morte feminina por câncer no Brasil (INCA, 2019). O risco de infecção persistente por HPV aumenta se a paciente possui vários parceiros, for tabagista e usar pílulas anticoncepcionais por tempo prolongado.

O Papilomavírus (PV) é um vírus pequeno, de DNA fita dupla, e faz parte da família *Papillomaviridae*; infecta principalmente o epitélio estratificado (pele e mucosas) de muitos animais, inclusive humanos. São vírus não envelopados, de 55 nm de diâmetro e simetria icosaédrica, com 72 capsômeros. Seu genoma é circular, com 6.800 a 8.400 pares de bases. Cerca de 40 tipos de HPV infectam células epiteliais do trato genital. De acordo com o tipo de lesão causada, os tipos de HPV genitais são classificados como de alto ou baixo risco oncogênico, sendo os tipos 16 e 18 os principais envolvidos em casos de câncer cervical (70 % dos casos) (Trabulsi & Alterthum. 2015).

A transmissão se dá através de relações sexuais, os quais frequentemente causam pequenos traumas na superfície epitelial; assim, o vírus alcança a camada de células basais e então se prolifera até atingir 50-100 cópias por célula. A taxa de mulheres que desenvolve câncer de colo uterino é relativamente baixa, mesmo entre as infectadas pelo HPV, as quais podem demorar anos para o desenvolverem; isso demonstra a existência de fatores concomitantes, como o estado imune, múltiplas gravidezes, o uso de drogas em geral, precocidade sexual, trocas frequentes de parceiro sexual e consumo de contraceptivos orais. As alterações epiteliais podem ser detectadas através dos exames de Papanicolau, colposcopia e do teste de detecção de DNA (PCR) (INCA,2019).

Os primeiros registros conhecidos do uso de plantas com fins medicinais são as Sagradas Escrituras e o papiro de Ebers, o qual pertence a época da XVIII dinastia do Egito. A civilização grega levou ao mundo estudiosos destacados como Hipócrates (pai da medicina moderna e autor do conceito de *Natura medicatrix*) e Teofrasto, autor do registro do uso da *Papaver somniferum*, da qual extrai-se a morfina. Um dos exemplos mais famosos é o uso de folhas de coca (*Erythroxylum coca*) pelos povos andinos, o qual remonta a 5.000 anos atrás (Pinto et al, 2002). Porém, foi apenas no início do século XIX que surgiram os primeiros estudos científicos sobre plantas, amparados pelo desenvolvimento da Química (Montanari & Bolzani, 2001). Esses exemplos mencionados são apenas alguns entre milhares de casos.

O século XX após a segunda guerra mundial foi marcado pelo surgimento dos antibióticos de fermentação microbiana e pelo intenso desenvolvimento de fármacos sintéticos, levando ao declínio no uso de plantas medicinais. Essa situação mudou nas últimas décadas: houve um aumento pela procura e consumo de produtos naturais, como no caso da arnica brasileira (Montanari & Bolzani, 2001). Entre os fármacos que possuem princípios ativos de origem natural, temos os quimioterápicos vincristina (Oncovin®), vimblastina (Velban®) e o Taxol®.

O vegetal *Solidago microglossa* (Figura 1), popularmente conhecida como arnica brasileira, arnica nacional, arnica do Brasil, arnica da horta, e vários outros. É nativa da América do Sul (Sudeste e Sul do Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina). Seus usos na medicina popular são como anti-inflamatório, analgésico, estomáquico, adstringente, cicatrizante e para o tratamento de feridas, traumatismos e contusões (Campelo et al, 2017).



**Figura 1:** *Solidago microglossa*.

Diante a biodiversidade brasileira, na busca de novos compostos para serem utilizados na terapia do câncer, este trabalho visa avaliar o potencial antiproliferativo de *S. microglossa* em cultura de células de câncer cervical HeLa.

## **2. REVISÃO LITERÁRIA:**

### **2.1. O HPV, o câncer cervical e o tratamento:**

O HPV é um vírus de DNA fita dupla e circular, contituído por 6.800 a 8.400 pares de bases; constituem a família *Papillomaviridae*, e causam infecções no epitélio estratificado da pele e mucosas de animais e humanos. O vírus não-envelopado, possui cerca de 55 nm de diâmetro e simetria icosaédrica, formada por 72 capsômeros (Trabulsi & Althertum,2015).

O genoma é dividido em LCR (região de controle longa), que constitui cerca de 10% do genoma e está envolvido no processo de transcrição e replicação do HPV, E (região precoce), que traduz proteínas de manutenção do genoma, assim como regulação e replicação do ciclo celular, e L (região tardia), que sintetiza proteínas formadoras do capsídeo. Algumas cepas possuem duas ORF (open reading frames – janelas abertas de leitura), E3 e E8, mas não se sabe qual a função destas (Trabulsi & Althertum, 2015).

O câncer do colo do útero é relacionado à infecção resistente pelos subtipos de alto risco oncogênico, e os subtipos 16 e 18 do papilomavírus humano são responsáveis por 70% dos casos deste tipo de câncer (WHO, 2010). O HPV é comum entre mulheres jovens e sexualmente ativas; espera-se que 80% destas adquiram o vírus ao longo da vida. Estima-se que no mundo existam 290 milhões de portadoras do HPV, e destas, que 32 % possuam o HPV 16, HPV 18, ou estejam infectadas com ambos os subtipos (de SANJOSÉ et al, 2007). Porém, há uma incidência anual de 500 mil casos de câncer cervical (WHO, 2010), indicando que apenas a infecção não é o suficiente para o desenvolvimento da doença. Ou seja, são necessários outros fatores em conjunto com a presença do agente infeccioso. É muito comum que a infecção por HPV seja controlada pelo organismo e dure apenas de 6 meses a dois anos

após o contato com o vírus (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, 2007). Mas nos casos de infecção persistente por cepas oncogênicas, existe a possibilidade de aparecerem lesões dos tipos intraepitelial escamosa e adenocarcinoma *in situ*; para que evitar o desenvolvimento do câncer invasivo, é preciso realizar a identificação destas lesões e o tratamento da paciente (WHO, 2010).

O tratamento para o câncer cervical varia em função de fatores como idade, desejo de preservação da fertilidade, tamanho do tumor e estágio da doença. As lesões precursoras são: lesão intraepitelial escamosa de alto grau (citologia), neoplasia intraepitelial cervical 2 e 3 (histologia) e adenocarcinoma *in situ* (INCA,2018).Após o diagnóstico por colposcopia ou histologia, é realizada a remoção cirúrgica da zona de transformação, através do método de eletrocirurgia, quando o tumor está presente apenas à ectocérvice ou alcança o primeiro centímetro do canal endocervical ( KATTUKARAN, A. et al, 2002). Quando a colposcopia é insatisfatória, ou quando a lesão ultrapassa o primeiro centímetro do canal cervical, o tratamento indicado é a conização por eletrocirurgia (INCA, 2018). A escolha do tratamento varia de acordo com o estágio em que se encontra o câncer. No estágio inicial, pode-se optar pela conização ou pela traquelectomia radical com linfadenectomia por via laparoscópica; no caso de estádios IB2, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IVA, é recomendável a realização de tratamento quimioterápico concomitantemente à radioterapia - RT (INCA, 2018). Para casos de câncer avançados, pode-se optar pela braquiterapia. Esta é uma modalidade de radioterapia no qual um condutor é inserido no útero para aplicação da radiação.

A radioterapia é uma forma de tratamento que faz uso da radiação ionizante (mais comumente o raio X) para eliminar o tumor ou diminuir o seu tamanho antes de uma cirurgia, assim como para eliminar células cancerígenas remanescentes após o procedimento cirúrgico. Em 1982, Radiation Therapy Oncology Group - RTOG criou o Critério de Escore para Morbidade Aguda por Radiação (Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria), que classifica os efeitos da radioterapia em uma escala de 0 a 4, segundo o local do corpo tratado (Freitas



Silveira et al, 2016). Quando se realiza a RT para câncer cervical, não só esta região é afetada; outros órgãos abdominais sofrem efeitos colaterais, como por exemplo os intestinos, a região anogenital, o sistema urinário e a pele. Os principais efeitos adversos são radiodermite, gastroenterite, retite, cistite, alopecia, estenose vaginal, hematoquesia, infecções do trato urinário (Bessa, 2018).

No caso do câncer cervical, a quimioterapia deve ser realizada em conjunto com a radioterapia. Bessa (2018) realizou um estudo com 86 pacientes portadoras de câncer cervical, sem restrição de idade ou estadiamento; este grupo foi dividido entre pacientes que realizaram radioterapia isolada e as que realizaram radioquimioterapia-RQT. Desse grupo, 73% manifestaram toxicidade aguda; destes, 47% tiveram um sintoma e 27% tiveram dois ou mais sintomas. Foi demonstrado neste trabalho que o uso de quimioterápicos aumenta a toxicidade do tratamento, pois houve 14,3% de casos de toxicidade grave, nos quais os pacientes realizavam RQT.

Em um estudo realizado por Freitas Silveira e Colaboradores, as cinco pacientes portadoras de câncer cervical apresentaram lesões de grau zero na primeira avaliação; porém, nas semanas seguintes, algumas apresentaram lesões que variaram de um a três, sendo que uma destas fazia tratamento quimioterápico concomitante. Neste mesmo estudo, a quimioterapia foi interrompida na terceira semana, levando a uma queda do grau de toxicidade.

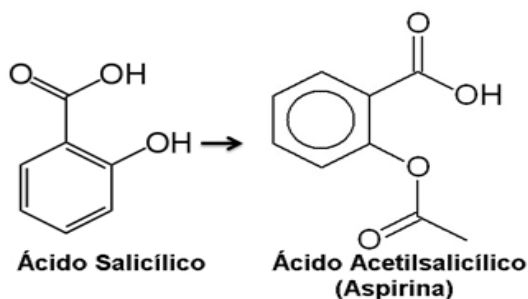
## **2.2. Busca por novos compostos em produtos naturais:**

Desde os primórdios, a humanidade faz uso de plantas medicinais para tratar os mais diversos sintomas, como azia, cólicas, febre, infecções, entre milhares de outros, assim como também com finalidade defensiva/predatória; os nativos sul-americanos utilizavam largamente o curare para caçar animais, por exemplo. As diversas civilizações e culturas ao redor do mundo desenvolveram e legaram várias técnicas para o preparo e uso de substâncias

extraídas majoritariamente de plantas, mas também de outros seres como fungos e animais (este último tem como exemplo clássico as cobras) (Referência).

Até 1898, ano da primeira síntese do ácido acetilsalicílico (AAS), a descoberta de novos compostos com atividade biológica era feita ao acaso, como foi o caso do ópio e do curare. A descoberta do AAS (Figura 2) marcou o início da síntese de medicamentos. Após este, diversos outros fármacos sintéticos foram desenvolvidos, como o barbital (agente hipnótico), a epinefrina (broncodilatador, descongestionante nasal), benzocaína e procaína (anestésicos locais) (Viegas et al, 2006).

No século XX, durante a II Guerra Mundial, houve diversos avanços na área de Química Sintética (planejamento racional de fármacos), para o tratamento de infecções e ferimentos dos soldados nos campos de batalha. Neste período surgiu a sulfonamida, um derivado do corante prontosil, que apresenta atividade bacteriostática e que foi fundamental neste período da história (referência)



**Figura 2:** Estrutura química da Aspirina, derivada do ácido salicílico.

Após a II Guerra, houve a perda de interesse na pesquisa de produtos de origem natural, decorrente do notável desenvolvimento de medicamentos sintéticos, como por exemplo, os antibióticos produzidos por fermentação microbiana (Motanari e Bolzani, 2001). Mas em dado momento, a indústria farmacêutica se deparou com um problema: das milhares de substâncias sintetizadas, apenas algumas atravessavam as fases pré-clínica e clínica, e um número menor ainda chegava ao mercado como medicamento – necessitando para isso o aval

dos órgãos de regulamentação locais e, como consequência, aumentando os custos da produção.

Deste modo, as empresas passaram a investir em ferramentas de biologia molecular e genética, isolando e purificando receptores potenciais, e desenvolvendo moléculas específicas para estes; tornou-se possível a avaliação de milhares de novos compostos, revolucionando a indústria farmacêutica (Viegas et al, 2006). Soma-se a isso o aumento pela demanda de produtos naturais no ocidente, devido à busca por um estilo de vida mais saudável (Montanari e Bolzani, 2001). Entre os principais fármacos elaborados a partir de produtos de origem natural, existem os quimioterápicos Taxol®, Vincristina®, Vinblastina®, e milhares de outros exemplos.

Enfim, pode-se observar que a importância dos produtos naturais na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, que o Brasil com a sua biodiversidade, torna-se uma ampla área para a busca de novas substâncias com potencial farmacológico.

### **2.3. Família Asteraceae e o Gênero *Solidago*:**

Asteraceae é uma das famílias de plantas mais ricamente representada, contando com cerca de 1.600 gêneros e 23.000 subespécies (Andenberg et al., 2007). O Brasil conta com aproximadamente 180 gêneros e 1.900 espécies, distribuídas em diferentes formações de vegetação (Nakajima & Semir, 2001). Esta família pertence a ordem Asterales, subordem Asteridae, e possui as seguintes características (Figura 3): inflorescências racemosas em capítulos, com flores individuais epíginas que são rodeadas por uma a várias fileiras de brácteas envolvendo-as, sobre o receptáculo comum no qual termina o ramo da flor (Weberling, 1989).



**Figura 3:** Estrutura básica da família Asteraceae.

É o gênero *Solidago* possui aproximadamente 120 espécies, dos quais a maioria é nativa da América do Norte. É rico em espécies que possuem atividades terapêuticas, e uma de suas características marcantes é a presença de diterpenos clerodânicos e labdânicos (Torres, Roque e Akissue, 1989). As espécies mais importantes deste gênero na América do Norte e na Europa são *Solidago canadensis* e *Solidago virgaurea*; estas são utilizadas como anti-espasmódico leve, diurético e anti-inflamatório em suas regiões de origem (Fetrow e Avila, 2000). Possuem flavonoides e saponinas, as quais são atribuídos seus efeitos farmacológicos. Apesar disto, quando estes componentes são isolados do vegetal, não apresentam a mesma atividade.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o potencial antiproliferativo de *Solidago microglossa* em células de carcinoma cervical HeLa.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

Preparar os extratos das folhas de *S. microglossa* utilizando dois solventes: etanol 99% e acetato de etila;

Avaliar a atividade antiproliferativa dos extratos em células de carcinoma cervical da linhagem HeLa;

Quantificar os compostos fenólicos e flavonoides totais;

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **4.1. Coleta e Preparo dos Extratos:**

Em janeiro de 2015, as folhas de *S. microglossa* foram coletadas em Nova Friburgo, Estado do Rio de Janeiro, identificadas e postas para secar em estufa de ar circulante, à 60 °C; após secas, foram pulverizadas. Uma parte do pó das folhas foi macerada com etanol (SFE), e a outra com acetato de etila (SFA). Depois de em maceração por três dias, os extratos foram secos e armazenados ao abrigo da luz e da umidade.

#### **4.2. Avaliação da Atividade Antiproliferativa:**

Em uma placa de 96 poços, células da linhagem HeLa foram semeadas, na quantidade de  $3 \times 10^4$  células/mL de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. A placa foi mantida em estufa durante 24h, na temperatura de 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>. Após isso este tempo, aplicou-se os extratos etanólico e de acetato de etila de *S. microglossa* nas concentrações de 15 à 250 µg/mL e as células foram novamente incubadas a 37° C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 48h – foi utilizado meio como controle

negativo, o qual foi considerado como tendo 100% de viabilidade celular. Após essa etapa, o meio com os tratamentos foi retirado e aplicou-se o reagente MTT dissolvido em meio de cultura, foi levado à estufa incubadas a 37° C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4h. Após este tempo, retirou o meio e aplicou-se 100µL de DMSO e a placa levada para o espectrofotômetro, e feita a leitura da placa a 570 nm. A análise estatística foi feita no software GraphPad Prism, utilizando os testes: One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

### **4.3. Quantificação de compostos fenólicos totais:**

Foi realizadaa quantificação dos fenólicos totais pelo o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Piccinelli et al, 2004; Nackz e Shahidi, 2004). Sendo assim, os extratos foram solubilizados em etanol na concentração de 200 µg/mL. A substância de referência foi o ácido gálico, para o qual foi elaborada a curva analítica nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 100; e 200 µg/mL. As absorbâncias do ácido Gálico e das frações foram lidas no espectrofotômetro (730 nm), e os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalente (AGE) por grama de extrato ou fração em base seca (µg de AGE/mg). O experimento foi realizado em triplicata.

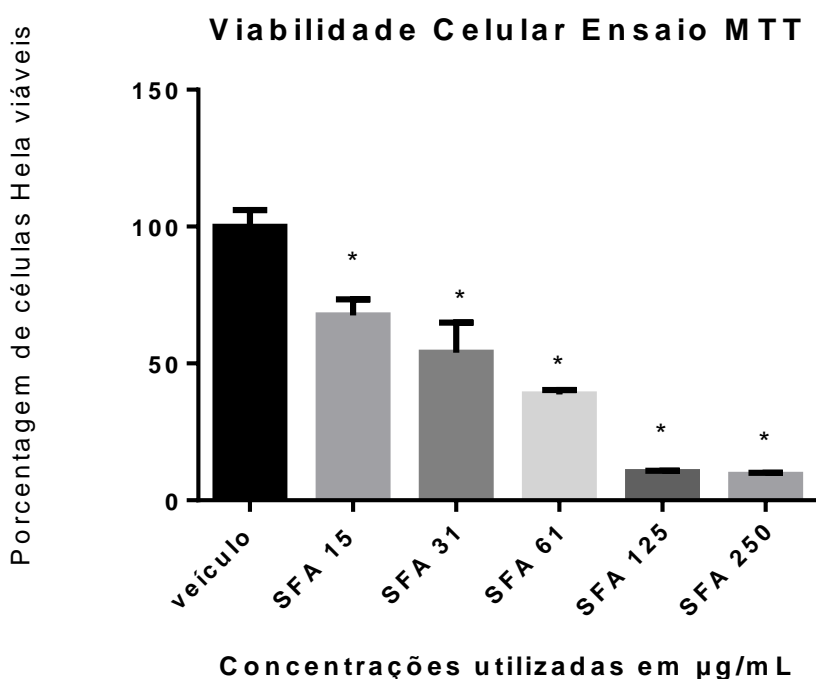
### **4.4 Quantificação de Flavonoides Totais:**

Para a quantificação de flavonoides totais foi realizado o ensaio espectrofotométrico fundamentado na ligação do íon Al<sup>3+</sup> e o grupo carbonila da molécula de flavonoide. Assim, em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µL de água, 60 µL de etanol, 10 µL de cloreto de alumínio (solução aquosa de 40 mg/mL), 10 µL de acetato de sódio (solução aquosa de 32,81 mg/mL) e 200 µg/mL dos extratos e frações. A substância de referência foi o flavonoide quercetina, para a qual foi elaborada a curva analítica nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100, 150 e 200 µg/mL. Então, as amostras e os padrões foram incubados por 30 minutos, e feita à análise em espectrofotômetro em 415 nm; Os resultados foram expressos em µg de equivalente de quercetina por miligrama de extrato ou fração em base seca (µg de E quercetina/mg). O experimento foi realizado em triplicata.

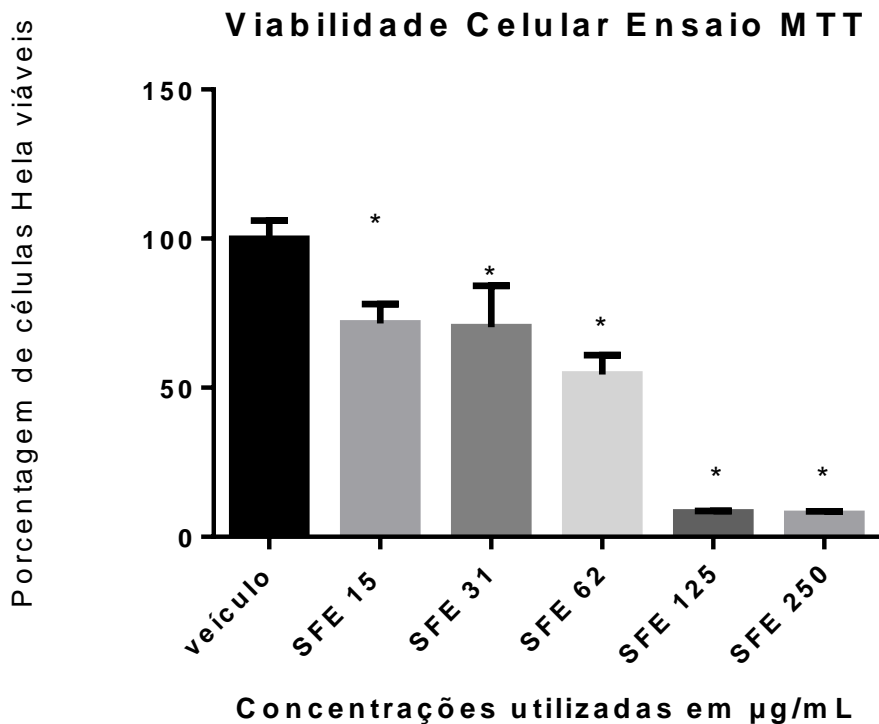
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 5.1. Atividade Antiproliferativa/Quantificação de Compostos:

A avaliação do potencial antiproliferativo em culturas de células é considerado o ensaio inicial para busca de compostos com potencial para o tratamento do câncer. Após 48h de tratamento das células HeLa com os extratos foi possível calcular a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ). Os extratos das folhas de *S. microglossa* foram capazes de inibir o crescimento destas células cancerosas, sendo que o extrato etanólico (SFE) apresentou  $IC_{50} = 58,64 \mu\text{g/mL}$  e o extrato SFA apresentou  $IC_{50} = 38,15 \mu\text{g/mL}$ , conforme as figuras 4 e 5.



**Figura 4:** Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de câncer cervical (HeLa) após o tratamento com a fração acetato de etila das folhas de *S. microglossa* (SFA). Através do programa GraphPad Prism foi realizada a análise estatística (Anova seguido do Teste de Tukey) e considerando o grupo tratado com veículo como tendo 100% de células viáveis, pode-se observar diferença estatística, em \*, quando comparado com veículo.



**Figura 5:** Avaliação da viabilidade celular do ensaio MTT, com a linhagem celular de câncer cervical (HeLa) após o tratamento com o extrato etanólico das folhas de *S. microglossa* (SFE). Através do programa GraphPad Prism foi realizada a análise estatística (Anova seguido do Teste de Tukey) e considerando o grupo tratado com veículo como tendo 100% de células viáveis, pode-se observar diferença estatística, em \*, quando comparado com veículo.

Em SFE, a concentração de fenólicos totais foi de 0,69 ( $\pm 1,22$ )  $\mu\text{g}$  EAG/mg (micrograma ácido gálico equivalente para cada mg de base seca do extrato)), e 1,50 ( $\pm 0,12$ ) micrograma quercetina equivalente para cada mg de base seca do extrato ( $\mu\text{g}$  E quercetina/mg) de flavonoides totais. Em SFA, a concentração de fenólicos totais foi de 0,56( $\pm 0,03$ )  $\mu\text{g}$  EAG/mg e a concentração de flavonoides totais foi de 2,59 ( $\pm 0,52$ )  $\mu\text{g}$  E quercetina/mg. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3).

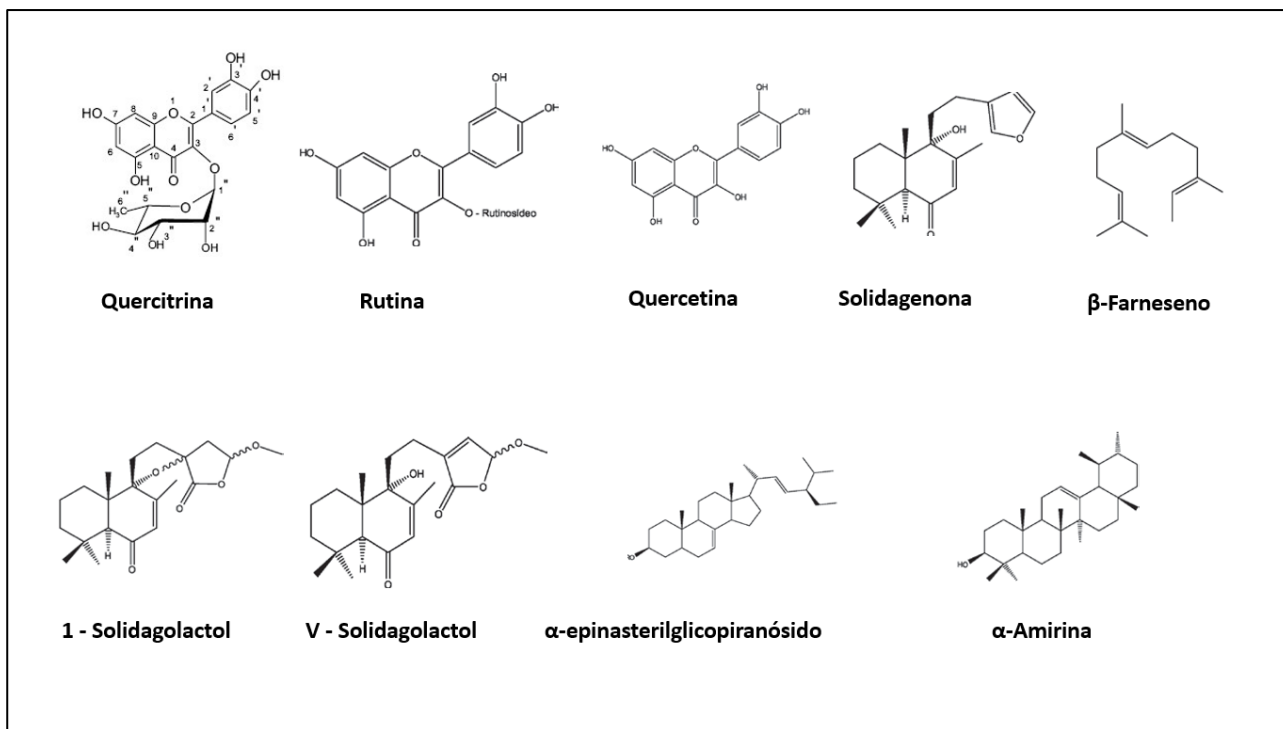
Pode-se observar, que o extrato preparado com o solvente acetato de tila apresentou melhor atividade antiproliferativa quando comparado ao extrato preparado com etanol. Também pode-se observar que o extrato de acetato de etila apresentou uma maior concentração de flavonoides totais. Diante, destes resultados, pode-se relacionar a maior



concentração de flavonoides totais, com a melhor atividade antiproliferaiva, e que solventes de média polaridade, como o acetato de etila, é uma melhor opção para extração destes compostos, do que solventes de alta polaridade, como o etanol.

*S. microglossa* é uma espécie bem estudada, e resultados anteriores demonstram que a tintura da parte aérea de Arnica possui ação inibitória sobre as bactérias *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, medida através da concentração inibitória mínima (CIM), a qual foi de 7,810 mg/mL para *S. mutans* e 1,953 mg/mL para *L. casei* (Freires et al., 2010). Estudos com o extrato hidroalcoólico de arnica possui forte atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Duarte et al., 2004). Griza (2007) demonstrou que o extrato metanólico e os compostos isolados quercitrina,  $\alpha$ -spinasterol e solidagenona apresentam atividade antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus epidermides*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella setubal*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. *S. microglossa* possui compostos flavonoides como a quercitrina, rutina e quercetina (Figuras 6) que estão presentes nas partes aéreas, taninos, saponinas, alcaloides e óleos essenciais diterpênicos, todos provenientes das partes aéreas do vegetal (BAGATINI, 2009). Vale destacar que o teor de alcaloides varia de acordo com as estações do ano (CHICOUREL et al, 1997). São oriundos das raízes os compostos diterpênicos inulina, ácidos quínico, caféico, clorogênico, hidrocínâmico (BAGATINI et al, 2009), e campferol (GRIZA ,2007).

As flores e rizoma apresentam o composto solidagenona (Figura 6), um diterpeno, que previne úlceras (LEDA & TOMASSINI, 2002). Além de solidagenona e dos flavonoides, outros compostos detectados nas partes aéreas de *S. microglossa* são o solidagolactol e seus derivados  $\alpha$ -epinasterilglicopiranosídeo, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido clerodânico,  $\beta$ -farneseno e  $\alpha$ -amirina (Figura 6) (Torres et al, 1989).



**Figura 6:** Estrutura química de compostos identificados em *Solidago microglossa*.

Quanto à toxicidade, foi demonstrado que infusões de *S. microglossa* na concentração de 14 mg/mL são capazes de reduzir consideravelmente o índice mitótico das células meristemáticas de *A. cepa*; ou seja, as infusões apresentaram efeito antiproliferativo e citotóxico – este último apenas na concentração mais alta indicada no estudo. Como não houve alterações cromossômicas, conclui-se que arnica brasileira não possui capacidade para induzir mutações no DNA (Bagatini et al, 2009)

Diante dos dados da literatura e dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que *S. microglossa* apresenta um potencial farmacológico, e que novos estudos devem ser incentivados para a busca de novas moléculas com atividade antitumoral.

## 6. CONCLUSÃO:

Conclui-se que *S. microglossa* possui atividade antiproliferativa contra células de carcinoma cervical. Os extratos apresentam na composição compostos fenólicos e flavonoides, sendo que estes se concentraram no extrato que utilizou acetato de etila, e os compostos fenólicos se concentraram no extrato preparado com etanol.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS:

As perspectivas para o futuro são a avaliação dos extratos na alteração da carga viral de células infectadas pelo HPV, e o desenvolvimento de algum tipo de medicamento de uso vaginal tópico (creme, pomada, gel, etc) com ação antiviral quando se detectar alterações pré-malignas, e o produto poderia auxiliar o processo de e eliminação do HPV antes de se instalar o câncer cervical.

## 8. REFERÊNCIAS

Andenberg et al. Compositae. Pg. 61- 588. In: J.W. Kadereit & C. Jeffrey (eds.). Flowering Plants Eudicots Asterales, Vol. VIII. The Families and Genera of Vascular Plants, K. Kubitzki (ed.). Springer – Verlag.

Bagatini MD, Fachinetto JM, Salva ACF, Tedesco SB. (2009) Efeitos citotóxicos das infusões (chá) de *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) no ciclo celular de *Allium cepa*. Rev. bras. farmacogn. Vol.19 no.2b, pp.632-636. ISSN 0102-695X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400022>.

Bessa LVT, Oliveira Junior B. (2018). Diferença de toxicidade em pacientes portadoras de câncer de colo de útero durante o tratamento com radioterapia isolada e radioquimioterapia. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu, 2018.

Campelo MF, Lameira AO, Costa KJA, Barbosa RKC. (2017) ESTUDO DE FENOFASES DA ESPÉCIE – *Solidago microglossa* DC. 21o Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental .

Chicourel EL, Pimenta DS, Jorge LIF, Ferro VO (1998). Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 7/8, n. 1/2, p. 59-66. ISSN 0102-695X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X1998000100007>.

Consolaro, M.E.L. Engler, S.S.M. Citologia Clínica Cérvico - vaginal: texto e atlas. 1ª edição, 95. São Paulo, editora Roca, 2014.

- Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, v.97(2), p. 305-11. PubMed PMID: 15707770.
- Freires IA, Alves LA, Jovito VC, Almeida LFD, Castro RD, Padilha WWN. (2010). Atividades antibacteriana e antiaderente in vitro de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. *Odontol. Clín.-Cient.* (Online) vol.9 no.2 (139-143) Recife Abr./Jun. 2010.
- Freitas Silveira C, Afonso RP, Oliveira SMB, Campos ML, Cristina ET, Riul SS. (2016) .Qualidade de vida e toxicidade por radiação em pacientes com câncer ginecológico e mama. *Escola Anna Nery* 20(4) Out-Dez 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/1414-8145.20160089>.
- Fetrow, C.W.; Avila, J.R. 2001. *Manual de Medicina Alternativa para o Profissional*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. RJ.
- Griza, F.T. Análise do perfil fitoquímico e avaliação de efeitos biológicos de *Solidago chilensis* MEYEN. 97f. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia aplicada), Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2007.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA), acessado em 16 de julho de 2019. Disponível em <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero/profissional-de-saude>.
- INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. Lyon: WHO; IARC, 2007. 636p. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 90)
- Kattukaran A, Kekre A, Jose R, Seshadri L. (2002). See & treat protocol for evaluation & management of cervical intraepithelial neoplasia. *The Indian journal of medical research*, New Delhi, v. 116, p. 106-110, PubMed PMID: 12619449.
- Leda PH, Tomassini TCB. (2002) *Solidago microglossa* DC: Estudos dos constituintes presentes nas suas flores. XVII-Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2002.
- Montanari, CA., Bolzani, VS. (2001). Planejamento Racional de Fármacos baseado em produtos naturais. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 105-111, 2001. ISSN 1678-7064
- Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA. (2002) Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 25, Supl. 1, 45-61. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>
- Trabulsi LR, Alterthum F. (2015). *Microbiologia*, 6ª edição, 771-774. São Paulo, editora Atheneu, 2015.
- Torres, LMR, Akisue MK, Roque NF. (1987). Quercetrina em *Solidago microglossa* DC, A Arnica do Brasil. *Revista Farmacia e Bioquímica*, v.23, p.33-40.
- Torres LMB, Roque NF, Akisue MK. (1989) Diterpenes from the roots of *Solidago microglossa*. *Rev. Latinoam. Quím.*, 20 (1989), pp. 94-97
- Viegas CJ, Bolzani VS, Barreiro EJ. (2006). Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 2, 326-337, 2006. ISSN 1678-7064

WEBERLING, F., 1989. Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge, Univ. Press. xx, 405 pp. il. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(90\)90189-K](https://doi.org/10.1016/0169-5347(90)90189-K).

WORLD HEALTH ORGANIZATION ; ICO Information Centre on Human Papilloma Virus (HPV) and Cervical Cancer. Human papillomavirus and related cancers in Brazil. Disponível em: <[www.who.int/hpvcentre](http://www.who.int/hpvcentre)>. Acessado em 16 de julho de 2019.