

ANA LUIZA TONIOLO BOTASSO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE FLAVONÓIDES
ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vernonanthura tweedieana* (Asteraceae) EM
GLIOBLASTOMA

SÃO VICENTE

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

ANA LUIZA TONIOLO BOTASSO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE FLAVONÓIDES
ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Vernonanthura tweedieana* (Asteraceae) EM
GLIOBLASTOMA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da UNESP - Campus do Litoral Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título bacharel em Ciências Biológicas, com habilitação em Biologia Marinha.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

SÃO VICENTE

2025

B748a

Botasso, Ana Luiza Toniolo

Avaliação da atividade antitumoral in vitro de flavonoides isolados das folhas de *Vernonanthura tweediana* (Asteraceae) em glioblastoma / Ana Luiza Toniolo Botasso. -- São Vicente, 2025

42 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Luiz Felipe Domingues Passero

1. Glioblastoma. 2. *Vernonanthura tweediana*. 3. Luteolina. 4. Velutina. 5. 3-O-metilquercetina. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço imensamente aos meus pais, Angela Toniolo Botasso e Edimilson Antonio Botasso, que sempre me apoiaram durante toda a minha graduação e durante toda a minha vida e agradeço também ao meu irmão, Caio Toniolo Botasso, que me incentivou e me acompanhou, vocês foram e sempre serão meu porto seguro. Agradeço também aos meus tios e primos, que mesmo de longe se fizeram e se fazem presentes em todas as etapas da minha vida.

Agradeço ao professor Luiz Felipe Passero por ter me orientado neste TCC e pelo acolhimento, além de todos os ensinamentos e conselhos que foram me passados com muita paciência e sabedoria.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório, Lucilly e Diogo, por toda a ajuda durante os experimentos, conversas e amizade, a companhia de vocês alegrou meus dias no laboratório.

Agradeço também à minha república, Ana Caroline, Gabriela, Matheus Araújo e ao nosso agregado Matheus Vale, por todas as conversas, momentos e aconchego. Vocês tornaram o meu cotidiano muito mais leve e prazeroso, sou muito grata por todo o amor que recebo de vocês.

Agradeço à minha turma XIX: Ana Carolina, Annick, Carlos, Diana, Eduardo, Gustavo, Laena, Pietra, Sabrina Vargas e Thomas que foram meu abrigo durante esses anos. Obrigada pelos momentos e pelo carinho que sempre levarei comigo.

Agradeço também aos amigos que conheci durante a graduação, Eduarda, Guilherme Nadai, Luisa Speretta, Murilo, Gustavo Cassamassimo.

Aos meus amigos de infância, Ana Luiza Oliveira, Maria Luiza Tassitano e Thiago Penteado por todo o apoio, conforto e amor que recebi nesses 12 anos de amizade.

Agradeço ao Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista e ao Instituto de Estudos Avançados do Mar da UNESP por fornecer a estrutura necessária para a minha graduação e formação.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão do projeto regular de pesquisa 2023/01641-1.

RESUMO

Os glioblastomas são o tipo mais comum de tumor cerebral maligno primário, sendo considerado o mais agressivo e com um tratamento complexo. Nesse contexto, as terapias convencionais utilizadas atualmente apresentam diversos riscos e efeitos secundários, o que evidencia a necessidade de formulação de novas abordagens terapêuticas. Essa necessidade tem aumentado as pesquisas acerca de substâncias provenientes de produtos naturais, sobretudo de plantas terrestres como um tratamento alternativo. Assim, neste estudo, foi avaliada a atividade antitumoral *in vitro* dos flavonoides luteolina, 3-O-metil-quercetina e velutina, isolados das folhas de *Vernonanthura tweediana*, na linhagem U87-MG de glioblastoma. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada na linhagem U87-MG e comparada com a citotoxicidade do quimioterápico padrão utilizado no tratamento, a temozolomida (TMZ). A luteolina foi o composto mais ativo, apresentando concentração citotóxica 50% (CC₅₀) de $126,44 \pm 11,51 \mu\text{M}$ a 24 h e $31,87 \pm 6,06 \mu\text{M}$ a 72 h, seguido pela 3-O-metil-quercetina e velutina, cujas ações antitumorais se intensificaram ao longo do tempo. Por sua vez, a temozolomida apresentou ação anti-tumoral com CC₅₀ de $1447,69 \pm 19,85 \mu\text{M}$ a 24h e de $611,37 \pm 8,61 \mu\text{M}$ a 72h. Ensaios funcionais indicaram que todos os flavonoides induziram apoptose recente nas células U87 após 24h de incubação, sugerindo um mecanismo de morte celular associado à apoptose. Adicionalmente, 3-O-metil-quercetina e a velutina induziram o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) em U87-MG. Nenhum dos compostos alteraram o potencial de membrana mitocondrial. Portanto, os resultados apresentados evidenciam o potencial da planta *V. tweediana* como fonte de novas substâncias citotóxicas para glioblastoma, sendo a luteolina o flavonoide mais ativo.

Palavras-chave: Glioblastoma. *Vernonanthura tweediana*. Flavonoides. Luteolina, Velutina, 3-O-metilquercetina.

ABSTRACT

Glioblastomas are the most common type of primary malignant brain tumor, considered the most aggressive and challenging to treat. In this context, conventional therapies currently in use present various risks and side effects, highlighting the need for the development of new therapeutic approaches. This need has driven increasing research into substances derived from natural products, particularly terrestrial plants, as alternative treatments. In this study, the *in vitro* antitumor activity of the flavonoids luteolin, 3-O-methylquercetin, and velutin—isolated from the leaves of *Vernonanthura tweedieana*—was evaluated against the U87-MG glioblastoma cell line. The cytotoxicity of the compounds was assessed in U87-MG cells and compared with the cytotoxicity of the standard chemotherapeutic agent used in treatment, temozolomide (TMZ). Luteolin was the most active compound, presenting cytotoxic concentrations 50% (CC50) of $126.44 \pm 11.51 \mu\text{M}$ at 24 hours and $31.87 \pm 6.06 \mu\text{M}$ at 72 hours, followed by 3-O-methylquercetin and velutin, whose antitumor activities increased over time. Temozolomide, in turn, exhibited antitumor activity with CC50 values of $1447.69 \pm 19.85 \mu\text{M}$ at 24 hours and $611.37 \pm 8.61 \mu\text{M}$ at 72 hours. Functional assays indicated that all flavonoids induced early apoptosis in U87 cells after 24 hours of incubation, suggesting a mechanism of cell death associated with apoptosis. Additionally, 3-O-methylquercetin and velutin induced an increase in reactive oxygen species (ROS) in U87-MG cells. None of the compounds altered mitochondrial membrane potential. Therefore, the results highlight the potential of *V. tweedieana* as a source of novel cytotoxic substances for glioblastoma treatment, with luteolin being the most active flavonoid.

Keywords: Glioblastoma. *Vernonanthura tweedieana*. Flavonoids. Luteolin, Velutin, 3-O-methylquercetin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais de glioblastomas.....	1
1.2. Terapias.....	3
1.3. Produtos naturais.....	6
1.4. Gênero <i>Vernonanthura</i>	8
1.5. <i>Vernonanthura tweedieana</i>	8
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivos gerais.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Coleta da planta e isolamento dos flavonoides.....	11
3.2. Linhagem celular.....	12
3.3. Análise da inibição do crescimento das células tumorais.....	13
3.4. Ensaio funcionais.....	14
3.4.1. Apoptose.....	14
3.4.2. Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	15
3.4.3. Mitocôndrias.....	15
3.4.4. Análise estatística.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. Análise da inibição do crescimento das células tumorais da linhagem U87-MG.....	16
4.2. Ensaio funcionais.....	23
4.2.1. Avaliação da apoptose em células U87 incubadas com os flavonoides.....	23
4.2.2. Espécies reativas de oxigênio (EROS).....	27
4.2.3. Avaliação da alteração do potencial de membrana mitocondrial.....	28
5. CONCLUSÃO.....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais de glioblastomas

A definição de câncer é muito variável, porém a maioria das definições utilizadas na literatura seguem o conceito designado pelo Instituto Nacional de Câncer, que afirma que o câncer é uma doença na qual as células crescem e se proliferam de maneira incontrolável e anormal, no entanto, essa definição não considera que as células tumorais são transformadas e evoluem a partir disso (BROWN et al., 2023). Desse modo, o câncer, também chamado de tumor maligno, pode ser definido como uma doença caracterizada pelo crescimento e proliferação descontrolados de células transformadas, as quais evoluem através da seleção natural, adquirindo aspectos que favorecem sua sobrevivência e disseminação (BROWN et al., 2023). O câncer é uma preocupação recorrente na área da saúde, visto que é uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo responsável por uma a cada seis mortes (BRAY et al., 2024). Em 2022, ocorreram cerca de vinte milhões de novos casos e dez milhões de mortes relacionadas ao câncer, evidenciando um desafio para a saúde pública mundial (BRAY et al., 2024).

O desenvolvimento do câncer é um processo complexo, que envolve diversos eventos, como fatores genéticos, ambientais e o estilo de vida (BRAY et al., 2024). As alterações genéticas recebem mais importância e atenção, por serem a principal causa dessa condição, favorecendo o desenvolvimento dos tumores, já que resultam em uma proliferação descontrolada e gera resistência à morte celular programada, ou apoptose (HANAHA & WEINBERG, 2011), visto que a resistência à apoptose é uma das principais características dos tumores malignos (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2006).

Uma das consequências dessa proliferação rápida e desenfreada é a metástase, que consiste na disseminação das células cancerígenas para tecidos saudáveis. Esse processo consiste na desagregação das células do tumor primário, as quais invadem os sistemas circulatório e linfático, alcançando outras partes do organismo, onde estabelecem colônias que resultam na formação de novos tumores em diferentes locais do corpo, o que compromete o funcionamento dos órgãos, além de dificultar o tratamento e reduzir a possibilidade de cura (SAN JUAN et al, 2019).

Existem uma ampla variedade de tipos e subtipos de câncer que acometem seres humanos, cada um com suas particularidades e desafios, e isso se deve às

alterações genéticas. Assim, os tipos de câncer mais comuns são câncer de pulmão (12,4%), câncer de mama (11,6%), colorretal (9,6%), próstata (7,3%), de acordo com o Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN). No entanto, existem outros tipos que afetam diferentes órgãos e tecidos como o câncer cerebral, que apesar da baixa incidência (1,6%), apresenta uma alta taxa de mortalidade, sendo responsável por cerca de 3% das mortes decorrentes de câncer no mundo (BRAY et al., 2024), o que representa um grande desafio para a saúde pública mundial

Nesse sentido, os cânceres cerebrais podem ser considerados os mais complexos e desafiadores, devido à sua localização, no sistema nervoso central (SNC), e à complexidade desse sistema e do tecido cerebral. Apesar de não ser comum, esse tipo de câncer é uma preocupação mundial assim como no Brasil, onde é responsável por cerca de 10 mil casos e 9 mil mortes por ano (CHERNIESKI, 2025).

Mais especificamente, os cânceres cerebrais podem ser classificados em tumores primários e secundários. Os tumores cerebrais secundários, conhecidos por metástases cerebrais, são resultado da proliferação de células tumorais provenientes de outros órgãos, as quais se estabelecem no cérebro, estando associado a outros tipos de câncer, como o de mama, por exemplo (SAN JUAN et al, 2019). Já os tumores primários, se originam no sistema nervoso central, não sendo provenientes e nem estando associados a outros tipos de câncer e os exemplos mais comuns desse subtipo são os glioblastomas, meningiomas e gliomas (CHERNIESKI, 2025).

Os glioblastomas são caracterizados por serem um subtipo de tumor cerebral primário mais agressivo, por estarem associados a alterações em genes supressores de tumor, como TP53, e genes relacionados ao ciclo e crescimento celular, como EGFR. Nesse contexto, o glioblastoma, classificado como grau 4 pela OMS (Organização Mundial da Saúde), é o subtipo de tumor cerebral maligno primário mais comum, sendo responsável por, aproximadamente, 50,9% dos casos (BRAY et al., 2024) e, também, é considerado o mais agressivo, devido ao seu alto grau de celularidade, anaplasia, proliferação e necrose (TSAI et al., 2013). Ademais, é o subtipo com tratamento mais difícil (SOUZA et al., 2018), visto que sua remoção total através de cirurgia é difícil, devido a sua capacidade de infiltração no tecido circundante (ALIFIERIS & TRAFALIS, 2015), além da resistência aos tratamentos padrões, como a radioterapia e quimioterapia, o que aumenta a taxa de recorrência e reduz a média da sobrevivência dos pacientes (CHERNIESKI, 2025).

Com relação aos sintomas decorrentes do glioblastoma, são comuns dores de cabeça frequentes e convulsões, entre outros, apesar da manifestação dos sintomas depender da localização e tamanho do tumor, já o diagnóstico é realizado através de exames de imagem, como ressonância magnética nuclear (RMN) e tomografia computadorizada (TC), além de biópsia (CHERNIESKI, 2025).

3.2. Terapias

A radioterapia, cirurgia e quimioterapia são as terapias mais utilizadas atualmente, geralmente aplicadas simultaneamente, em pacientes com glioblastoma, apesar dos efeitos secundários decorrentes desses tratamentos (HANAHAAN & WEINBERG, 2011; DIECKMANN, 2010; YONG & LONSER, 2011).

Com relação à radioterapia, que é utilizada, especialmente, para controle local do tumor, os seus efeitos colaterais consistem na necrose de tecidos saudáveis devido à radiação já foram descritos em, aproximadamente, 30% dos pacientes submetidos à esse tratamento, além de danos cognitivos, principalmente em tratamentos a longo prazo (DIECKMANN, 2010).

No que diz respeito à cirurgia, mais especificamente, à ressecção cirúrgica, seu objetivo principal é a remoção majoritária do tumor, considerando que a remoção total é inviável, visto que o glioblastoma infiltra o tecido circundante (ALIFIERIS & TRAFALIS, 2015). Em contrapartida, este procedimento pode gerar efeitos adversos e riscos graves aos pacientes submetidos a ele, como danos neurológicos que podem gerar impactos negativos, além da possibilidade de entrada de resíduos, até mesmo do próprio tumor, o que pode resultar na progressão do câncer e até outras infecções. (YONG & LONSER, 2011).

No tratamento utilizando a quimioterapia, ocorre a administração de diversos fármacos, entre eles, a temozolomida (TMZ), que foi aprovada para uso em pacientes adultos com glioblastoma em 2005 (LEE, 2016), é administrada via oral (ZHANG, STEVENS & BRADSHAW, 2012) e frequentemente é utilizada simultaneamente à radioterapia, já que essa associação aumenta a média de sobrevida do pacientes de 12,1 para 14,6 meses (LEE, 2016).

Mais especificamente, o processo pelo qual a temozolomida (TMZ) age contra as células tumorais de glioblastoma é complexo e conta com diversos meios de ação. A TMZ é um agente alquilante que ao ser absorvida, sofre hidrólise espontânea em pH

fisiológico, gerando a molécula 5-(3-metil-1-triazen-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC), a qual é instável. Assim, a MTIC reage com a água para formar a 4-amino-5-imidazolcarboxamida (AIC) e o íon metildiazônio, o qual é capaz de causar danos ao DNA por meio da metilação em diversas posições do DNA, sendo elas a N7 da guanina, N3 da adenina e O6 da guanina. Nessa última posição, a O6 da guanina, a reparação direta do DNA decorrente do processo de metilação resulta na apoptose das células tumorais, como demonstrado na figura 1. Nesse contexto, as células tumorais cerebrais possuem um pH mais alcalino com relação ao tecido saudável, o que facilita a ativação da TMZ, por isso, esse medicamento é utilizado no tratamento, não exclusivamente, na terapia desse tipo de câncer (ZHANG, STEVENS & BRADSHAW, 2012).

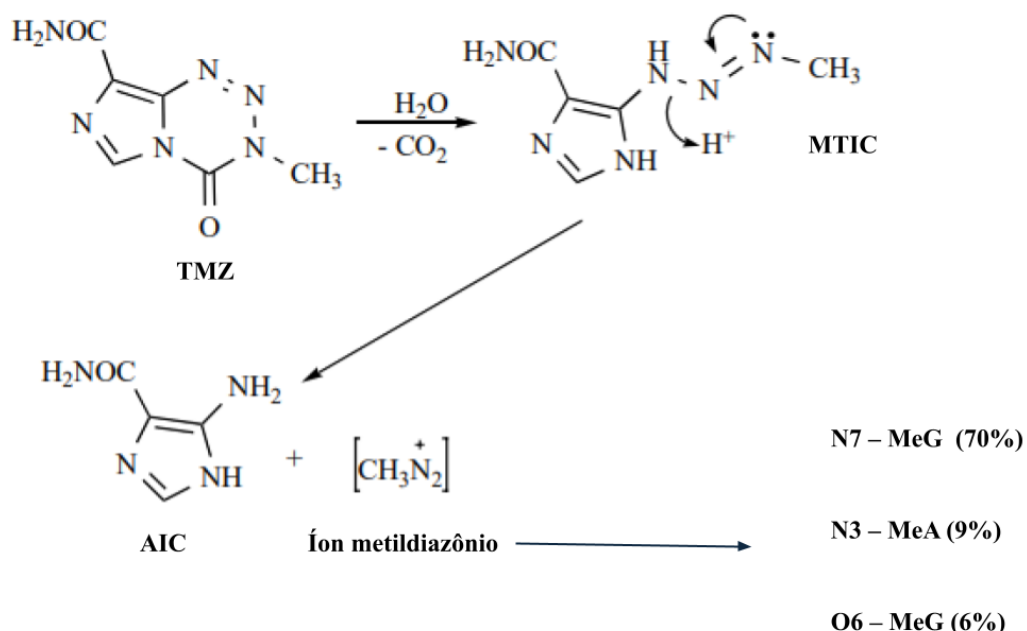


Figura 1 - Esquema representativo do mecanismo de ação da temozolomida (TMZ). O íon metildiazônio, formado a partir da hidrólização da TMZ, causa a metilação das posições N7 da guanina (N7 – MeG), N3 da adenina (N3 – MeA) e O6 da guanina (O6 – MeG). A metilação da O6 da guanina é a etapa letal para as células tumorais e é através dela que ocorre a ação da TMZ. Adaptado de (ZHANG, STEVENS, & BRADSHAW, 2012).

Apesar da atividade antitumoral e da alta biodisponibilidade da TMZ, sua eficácia é reduzida devido a barreira hematoencefálica, que protege o SNC, e isso limita a penetração de muitas moléculas de quimioterápicos e, consequentemente,

reduz a efetividade desse fármaco, por isso, apenas 20% da concentração plasmática atinge, de fato, o tecido cerebral (HERBENER, 2020). Além disso, as enzimas reparadoras presentes nas células tumorais, como MGMT (O-6-metilguanina-DNA metiltransferase), amenizam os efeitos dos fármacos alquilantes, como a TMZ, estão associadas à resistência das células cancerígenas à TMZ (ALIFIERIS & TRAFALIS, 2015).

A ocorrência desses tratamentos de maneira isolada, ou seja, a recomendação de apenas uma das terapias citadas, não é comum, por conta de suas limitações e a combinação mais utilizada é a radioterapia e a quimioterapia com TMZ. Essa associação é vantajosa, já que ao mesmo tempo que a radioterapia quebra a molécula de DNA das células cancerígenas, a temozolomida causa danos na posição O6 da guanina (CHERNIESKI, 2025). Entretanto, a associação desses dois tipos de terapias causa uma ampla diversidade de efeitos colaterais, como mielossupressão, náuseas, vômitos, fadiga e aumento do risco de infecções oportunistas (STUPP, et al, 2005).

Adicionalmente, a combinação da quimioterapia, com temozolomida, e radioterapia também pode estar associada à cirurgia, como forma de complementar a retirada parcial do tumor. Geralmente, a ressecção cirúrgica é realizada na etapa inicial do tratamento, a fim de remover o máximo do tumor, com o objetivo reduzir a carga tumoral inicial e, conseqüentemente, aliviar os sintomas e aumentar a eficácia das terapias complementares, que visam tratar a massa tumoral residual e prevenir a recorrência do glioblastoma. Todavia, é um método arriscado, já que há riscos de danos neurológicos permanentes (YONG & LONSER, 2011), principalmente, por ser um método mais invasivo.

No que diz respeito às abordagens terapêuticas utilizadas atualmente contra glioblastomas, é possível concluir que as três terapias descritas possuem uma série de efeitos adversos e riscos aos pacientes submetidos à elas (STUPP et al., 2005), tornando o tratamento ainda mais difícil e desgastante. Nesse contexto, é evidente a necessidade de novas abordagens terapêuticas que visam o aumento da sobrevida e do bem-estar dos pacientes. Assim, é importante e necessário o desenvolvimento de pesquisas acerca da caracterização de compostos biologicamente ativos alternativos, que podem ser potenciais alternativas para produção de novos quimioterápicos e formulação de novas terapias contra glioblastomas.

3.3 Produtos naturais

Uma das alternativas para a descoberta de compostos bioativos com potenciais atividades antitumorais, é explorar a diversidade molecular dos organismos, já que os seres vivos, tanto terrestres quanto marinhos, como plantas, algas, esponjas, microrganismos, entre muitos outros, são fontes de compostos com potencial terapêutico, apresentando atividade contra bactérias, vírus, parasitas e tumores (NEWMAN & CRAGG, 2020) e estes compostos podem agir conjuntamente ou separadamente a fim de manifestar atividades biológicas (SÜNTAR, 2020). Em especial, as plantas representam uma fonte inesgotável de compostos biologicamente ativos, como os metabólitos primários e secundários.

De uma maneira geral, os metabólitos primários são substâncias produzidas por todas as plantas e essenciais para seu crescimento e desenvolvimento, como os açúcares, aminoácidos, lipídeos, nucleotídeos e ácidos graxos (BORGES & AMORIM, 2020), que possuem as mesmas estruturas ou estruturas similares em todos os organismos. Já os metabólitos secundários, também chamados de metabólitos especializados, são específicos de cada espécie, possuem uma grande diversidade estrutural e desempenham um papel de manutenção, auxiliando na proteção contra estresses bióticos e abióticos, como infecções, predação, radiação UV, entre outras funções. Além disso, os metabólitos especializados são utilizados pela humanidade há muito tempo e para diversos fins, sendo comercializados pelas indústrias farmacêuticas, de corante e aromas (BORGES & AMORIM, 2020), inclusive para fins terapêuticos e o interesse por esses compostos vêm aumentando desde a descoberta que o seu consumo pode prevenir o câncer e outras doenças (AHARONI & GALILI, 2011). Nesse contexto, os metabólitos secundários podem ser divididos em 3 principais grupos, os compostos fenólicos, os terpenóides e os compostos nitrogenados, os quais são produzidos a partir dos metabólitos primários (AHARONI & GALILI, 2011).

Com relação aos grupos, os terpenóides são hidrocarbonetos naturais, variando de moléculas pequenas até hormônios e exercem, principalmente, a função de defesa contra insetos e seres herbívoros. Esse grupo abrange os monoterpenos, hemiterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos

(BORGES & AMORIM, 2020). Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um grupo fenol em sua estrutura e exercem uma diversidade de papéis, como defesa contra herbívoros e patógenos, fortalecimento, pigmentação e atividade alelopática, incluindo os taninos, lignina, flavonóides, isoflavonoides, entre outros (BORGES & AMORIM, 2020). Por fim, os compostos nitrogenados exercem funções na germinação, defesa contra insetos e incluem os glicosídeos cianogênicos, aminoácidos não proteicos e alcalóides, que por sua vez são comumente utilizados pela indústria farmacêutica (BORGES & AMORIM, 2020).

Nesse contexto, os produtos naturais foram e ainda são fundamentais na descoberta e no desenvolvimento de novos medicamentos contra infecções, doenças cardiovasculares e neurológicas, câncer, entre outros e isso ocorre devido, principalmente, à especificidade estrutural presente nos metabólitos e moléculas naturais, que se restringe, geralmente, à processos biossintéticos difíceis de se reproduzir de maneira sintética, em laboratórios (BOCSO & BUTNARIU, 2022). Ademais, os produtos naturais são utilizados como matéria-prima para medicamento há muito tempo e são uma fonte importante de moléculas com potencial antitumoral, visto que entre 1981 e 2019, mais de 30% de todos os medicamentos aprovados e mais de 60% dos medicamentos administrados contra câncer foram diretamente ou indiretamente derivados de compostos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2020).

Nesse contexto, as plantas medicinais e produtos terapêuticos naturais ainda são recorrentemente utilizados nos sistemas de saúde, visto que, aproximadamente 80% da população mundial depende exclusivamente de medicamentos provenientes de produtos naturais, principalmente em países em desenvolvimento (ASIGBAASE et al., 2023). Ademais, os produtos derivados de plantas medicinais possuem alto valor econômico, gerando cerca de 400 bilhões de dólares anualmente e a demanda por esse tipo de mercadoria cresce, aproximadamente, de 15 a 25% ao ano, além de ser uma alternativa de fonte de renda, contribuindo para o PIB (Produto Interno Bruto) de muitos países (ASIGBAASE et al., 2023). Segundo a Organização Mundial da Saúde, o comércio e consumo de produtos naturais atingirá cerca de 5 trilhões de dólares até 2050 (BOOKER, JOHNSTON & HEINRICH, 2012), o que evidencia a importância econômica e social global das plantas medicinais.

Portanto, as plantas medicinais e seus produtos derivados são de grande importância econômica, social e ecológica, evidenciando o potencial da biodiversidade mundial, incluindo a biodiversidade brasileira, para a descoberta de novas moléculas e

extratos com potencial terapêutico, por isso, as pesquisas acerca destes compostos e sua conservação e uso sustentável são necessários.

3.4. Gênero *Vernonanthura*

O gênero *Vernonanthura* pertence à família Asteraceae, a qual engloba uma grande diversidade de espécies vegetais de interesse terapêutico, como margaridas, marcela, arnica, camomila, entre outros exemplos. Esse gênero é caracterizado pela presença de caules eretos e xilopódio, além de suas inflorescências piramidais, com os ramos na forma do tipo cimosa (ROBINSON 1992). O próprio gênero *Vernonanthura* também possui atividades e propriedades terapêuticas (MACHADO et al., 2024) e alguns exemplos são *V. colorata*, com características antibacterianas e anti-inflamatórias, *V. phosphorica*, com atributos leishmanicidas, anti-inflamatórios e antimicrobianos, entre outras espécies (MACHADO et al., 2024).

3.5. *Vernonanthura tweedieana*

O gênero *Vernonanthura* engloba a espécie *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob., popularmente conhecida como “chamarrita” ou “assa peixe”, entre outros nomes (Figura 2A-C), é caracterizada por ser uma planta subarbustiva, de porte intermediário (DUARTE & CHELLA, 2014), que possui diversos efeitos terapêuticos, por isso, é uma planta utilizada por diversas populações para tratamento de dores no estômago e fígado, além de doenças respiratórias (MACHADO et al., 2024). Ademais, *V. tweedieana* é caracterizada farmacologicamente pela presença de moléculas bioativas em seus extratos com potencial antibacteriano, antifúngico, antioxidante, antinociceptivo e antiedematogênico (MACHADO et al., 2024). Além disso, sua raiz é usada no tratamento de doenças de pele, infecções fúngicas, entre outros (PORTILLO et al., 2005).

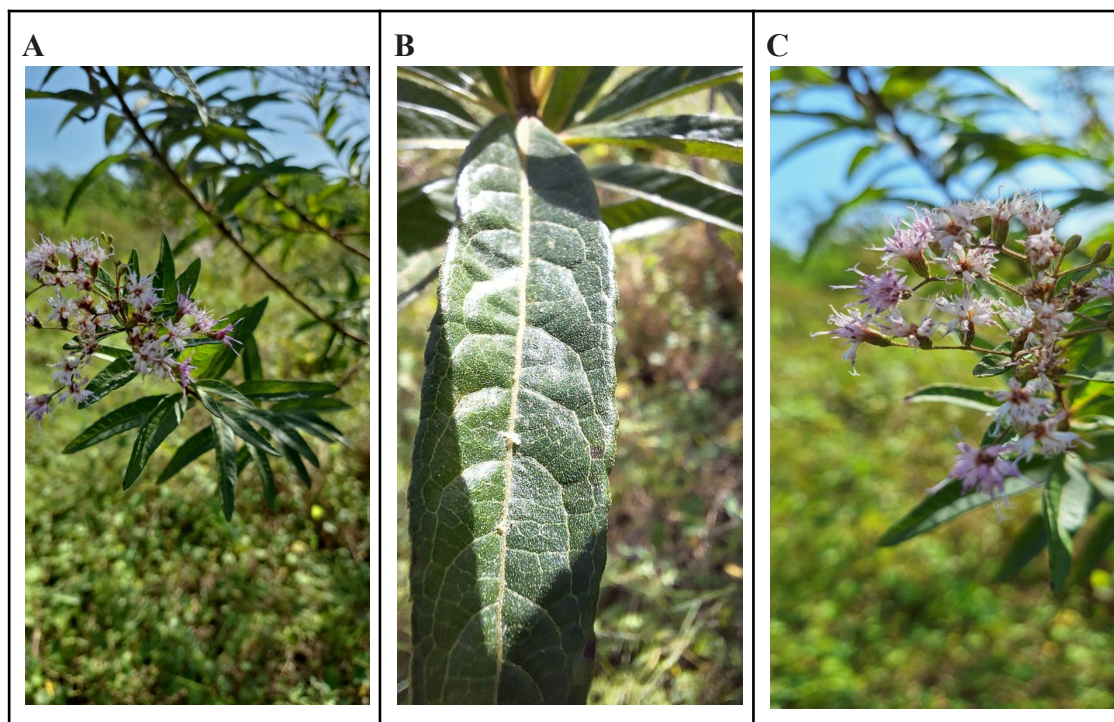


Figura 2 - *Vernonanthura tweedieana*. Árvore (A); Detalhes das folhas (B); Flores (C). Autoria própria.

Adicionalmente, a espécie *V. tweedieana* possui compostos que vêm recebendo cada vez mais destaque na área da saúde, os flavonoides. Os flavonoides são metabólitos secundários encontrados na grande maioria das plantas, presentes tanto nas consumidas na alimentação quanto em ervas medicinais (TSAI et al., 2016). Nas plantas, os flavonoides desempenham o papel de fito defensores e antioxidantes, oferecendo proteção contra estresses bióticos e abióticos, como radiação UV, infecções de micro-organismos, entre outros, além de atuar como reguladores dos hormônios vegetais (SALES, 2023).

Esses compostos possuem importância significativa na área medicinal, devido às suas atividades biológicas, visto que alguns estudos demonstraram suas propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, antivirais e antitumorais (NIJVELDT et al., 2001), com a capacidade de impedir o crescimento de células tumorais e o processo de metástase (TSAI et al., 2016). Além disso, alguns estudos demonstraram a capacidade dos flavonoides de abrandar a ação de estimulantes da angiogênese, um processo fundamental no crescimento de tumores e metástase (TSAI et al., 2016). Nesse contexto, os flavonoides são divididos em diversos subgrupos dependendo do grau de oxigenação, hidrogenação e padrões de acoplamento, sendo alguns exemplos, as flavonas, flavanonas, auronas, antocianinas. Alguns exemplos de flavonoides são

luteolina, 3-O-metilquercetina e velutina (Figura 3A-C), entre muitos outros (SALES, 2023).

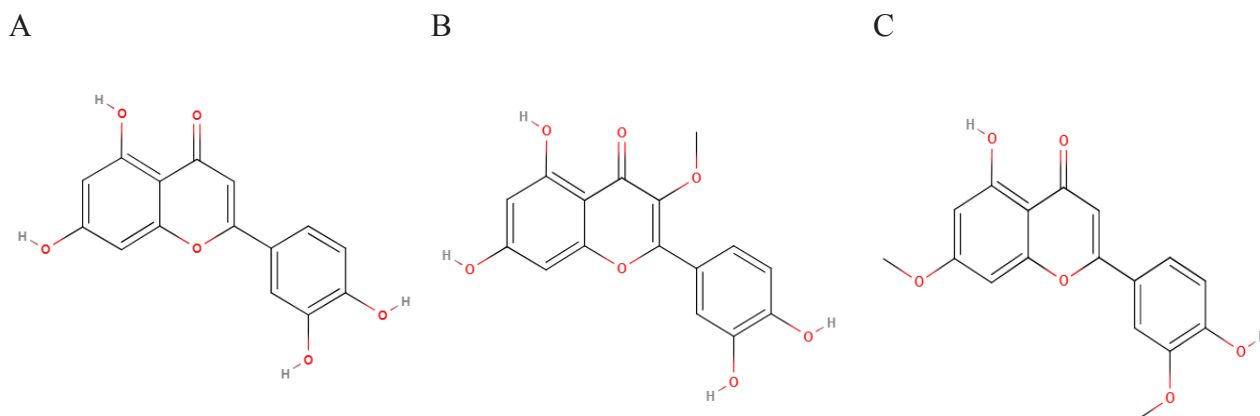


Figura 3 - Estrutura molecular dos flavonóides isolados da planta *Vernonanthura tweedieana* e utilizados neste estudo. **A** - Estrutura molecular da luteolina. **B** - Estrutura molecular da 3-O-metil-quercetina. **C** - Estrutura molecular da velutina. Fonte: PubChem.

Portanto, considerando as desvantagens das terapias aplicadas em glioblastomas atualmente, como a toxicidade, os riscos e os efeitos secundários da quimioterapia, radioterapia e ressecção cirúrgica, é de extrema importância e necessidade a pesquisa e descobertas acerca de novas alternativas terapêuticas para esse tipo de câncer. Nesse contexto, os flavonoides derivados de produtos naturais e plantas medicinais podem apresentar potenciais possibilidades para produção de novos medicamentos a fim de tratar os glioblastomas, aumentar a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes.

Por tais razões, este trabalho tem como objetivo avaliar a ação antitumoral *in vitro*, dos flavonóides luteolina, 3 -O-metil-quercetina e velutina isolados das folhas de *V. tweedieana*, em uma linhagem tumoral de glioblastoma, a U87.

2. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a ação antitumoral *in vitro*, dos flavonóides luteolina, 3-O-metil-quercetina e velutina isolados da planta *Vernonanthura tweedieana*, em linhagem tumoral de glioblastoma U87-MG e avaliar o mecanismo de ação das moléculas ativas.

4.2. Objetivos específicos

- Estimar a concentração citotóxica a 50% (CC₅₀) dos flavonoides luteolina, 3-O-metil-quercetina e velutina em glioblastoma (U87-MG) e comparar os resultados com a CC₅₀ da temozolomida (TMZ);
- Analisar se os flavonoides ativos induzem apoptose na linhagem U87-MG;
- Analisar se os flavonoides ativos alteram o potencial de membrana mitocondrial de células U87-MG;
- Avaliar se os flavonoides ativos podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio em células U87-MG

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta da planta e isolamento dos flavonoides

O material vegetal foi coletado na cidade de São Vicente, no estado de São Paulo (23°56'42"S 46°25'05"W), em fragmentos de Mata Atlântica, pelo Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero, em abril de 2024 (outono no hemisfério sul) e identificado pelo botânico Dr. Guilherme Antar do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). Para o estudo foram selecionadas as partes aéreas de *V. tweedieana* constituído por folhas e pequenas ramificações de galhos.

O processo de purificação dos compostos foi feito em colaboração com o Prof. Dr. João Henrique G. Lago da Universidade Federal do ABC (UFABC). Resumidamente, as partes aéreas da planta foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente em local arejado. Em seguida, todo o material foi triturado em

moinho de facas resultando em 150 g do vegetal moído que, em seguida, foi submetido à maceração em temperatura ambiente utilizando *n*-hexano (10 x 500 mL). Após esse passo, ao material vegetal residual foi realizado um novo processo de extração utilizando etanol (10 x 500 mL). A evaporação do solvente, sob pressão reduzida, forneceu 11 g de extrato etanólico bruto.

O extrato etanólico bruto (10 g) foi solubilizado em uma mistura de água e etanol em proporção 1:1 (200 mL) e transferido para um funil de separação. Foram realizadas extrações sucessivas utilizando *n*-hexano (3 x 100 mL), diclorometano (3 x 100 mL), acetato de etila (3 x 100 mL) e *n*-butanol (3 x 100 mL). Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida, foram obtidas as respectivas fases de partição: *n*-hexano (0,96 g), diclorometano (2,42 g), acetato de etila (1,44 g), *n*-butanol (1,68 g).

Uma parcela da fase diclorometano (CH₂Cl₂), oriunda do extrato etanólico (EtOH) das partes aéreas de *V. tweediana*, foi submetida a fracionamento em gel de Sephadex® LH-20. Após a eluição com metanol (MeOH) puro, foram obtidas 225 frações (15 mL cada) que foram analisadas por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) e reunidas em 18 grupos (A-R). Os grupos M, O e P se destacaram por conta do seu perfil cromatográfico observado nas CCDA. A fração P se mostrou constituída pela luteolina. A fração O foi submetida a separação por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Após o processo de eluição em sistema CH₂Cl₂:MeOH (8:2) e separação das substâncias, foi obtida a 3-O-metilquercetina. A fração M foi lavada com CHCl₃ de onde foi isolado a velutina.

Para cada fração e molécula pura foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono-13 no espectrômetro da Varian INOVA 500, operando na frequência de 500 MHz para RMN de ¹H e 125 MHz para RMN ¹³C objetivando identificar os flavonoides citados acima.

Por fim, os flavonoides foram diluídos em DMSO (Dimetilsulfóxido) para serem utilizados nos experimentos, a uma concentração de 10 mg/ml.

3.2. Linhagem celular

Para os experimentos, foi utilizada a linhagem U87-MG, isolada de casos humanos de glioblastoma, gentilmente doada pela Dra. Roseli da Silva, do HCFMUSP.

A linhagem U87-MG foi cultivada e mantida em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), que foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor a 56 °C por 7 minutos (Gibco - EUA), 1% de penicilina-estreptomicina e 3,7g/L de bicarbonato de sódio. As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 182 cm² e mantidas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂, e foram utilizadas nos experimentos quando a confluência atingiu, aproximadamente, 90%.

3.3. Análise da inibição do crescimento das células tumorais

A linhagem U87-MG foi ajustada a uma concentração de 2×10^5 células/mL em placas estéreis de 96 poços. A esses poços, foram adicionadas sete diferentes concentrações de luteolina, 3-O-metilquercetina e velutina, variando de 5,44 a 249,35 µM, 4,93 a 316,18 µM e 4,96 a 318, 17 µM, respectivamente, em triplicata. Nos grupos controles, sem adição de fármaco, foi adicionada apenas solução veículo de meio DMEM. A temozolomida (TMZ) foi incubada com as células tumorais em concentrações variando de 31,25 a 2000 µM, em 24 horas, e 24,14 µM a 3.090, 39 µM, em 72 horas.. As células foram incubadas por 24 e 72 horas com os compostos a 37 °C, em incubadora de CO₂ umidificada.

Após esses períodos, foram realizadas duas lavagens com tampão fosfato pH 7.4 (PBS) e a viabilidade celular foi avaliada utilizando resazurina 5% diluída em meio de cultura. Após 3 horas, aproximadamente, a fluorescência dos poços foi analisada em leitor de placas, utilizando o comprimento de onda de excitação em 544 nm e a de emissão em 590-10 nm.

Utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0 para Windows, foram estimadas as concentrações dos flavonoides que matam 50% (CC₅₀) da população de células e comparadas com a CC₅₀ da TMZ.

3.4. Ensaios funcionais

3.4.1. Avaliação da apoptose

Células U87-MG foram cultivadas em meio DMEM com os flavonoides e TMZ em suas respectivas CC_{50} , calculadas a 24h, durante um período total de 24h em placas de 24 poços (Corning). O grupo controle foi cultivado apenas com DMEM, e o controle positivo foi incubado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3,4% V/V (2,02 μ M). As células foram incubadas por 24 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO_2 .

Após esse período, as células foram tripsinizadas das placas e lavadas 3 vezes com meio de cultura. As células foram ajustadas a uma concentração de 2×10^5 células/mL em tubos do tipo eppendorfs. Em seguida, as células foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fischer, USA). Após 15 minutos, as células centrifugadas a 1500 rpm, 5 min para retirar o excesso de sondas não ligadas nas células, e então lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em FACS buffer (EDTA 2mM, albumina sérica bovina 1%, azida sódica em PBS).

A apoptose ou necrose foi avaliada no citômetro C6 Accuri, no qual foram adquiridos 50.000 eventos totais e o tipo de morte foi estudado utilizando a estratégia de *gate* apresentada na figura 4.

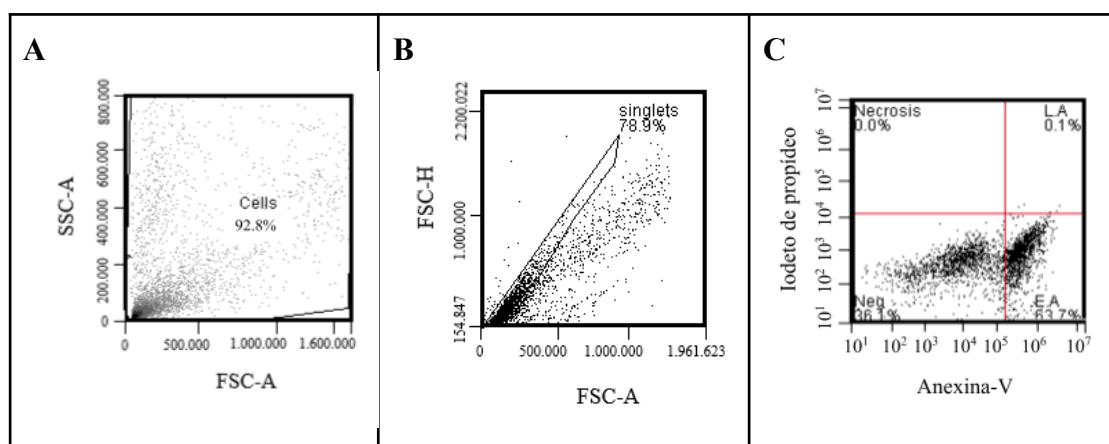


Figura 4 – Células U87-MG foram incubadas com H_2O_2 por 24h, seguido pela marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Inicialmente, a população celular inteira foi considerada (A), seguido pela seleção dos singlets (B), e por fim um gate foi

efetuado para caracterizar a população de células em apoptose recente (EA), apoptose tardia (LA) ou necrose (C).

3.4.2. Espécies reativas de oxigênio

As células foram tratadas conforme descrito no item 5.4.1, contudo cultivadas em placas de 96 poços pretas (Corning). Para avaliar a produção de ROS foi utilizada a sonda H₂DCFDA (diacetato de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína), a qual detecta o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. As células tratadas com os flavonoides e TMZ foram incubadas com 0.05 µg/poço de H₂DCFDA durante 1h a 37°C. Após o período, as células foram lavadas por três vezes com 100 µL de PBS e centrifugadas a 1000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, a fluorescência emitida pelas células foi lida no leitor de placa FLUOstar Omega com um comprimento de onda de excitação de 495 nm e emissão de 515 nm.

3.4.3. Alteração do potencial de membrana mitocondrial

As células U87-MG foram tratadas conforme descrito no item 5.4.1, contudo cultivadas em placas de 96 poços pretas (Corning). Diferentemente do item 5.4.1, o controle positivo foi incubado com 40 µM de FCCP (Carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi)fenil-hidrazona, Sigma Aldrich), um composto capaz de inibir o potencial de membrana mitocondrial. As células controle foram incubadas somente com DMEM. As células foram incubadas por 24 horas com os fármacos, e posteriormente, a sonda MitoTracker Green FM (Invitrogen) foi adicionada às células a uma concentração de 100 nM, que foram incubadas durante 30 minutos.

Após esse período, as células foram lavadas em PBS por três vezes, e então analisadas em um leitor de fluorescência com filtro de excitação em 485-12 nm e de emissão em 520 nm.

3.4.4. Análises estatísticas

Os experimentos com os flavonoides foram realizados em triplicata, enquanto os testes com a temozolomida foram realizados em duplicata e os dados expressos

como média $\pm$ desvio padrão. Foi feita a análise de variância (Teste-t) para determinar se havia diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras e os grupos controles utilizando o GraphPad Prism.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da inibição do crescimento das células tumorais da linhagem U87-MG.

Em relação aos testes de citotoxicidade utilizando o composto luteolina, foi observada ação antitumoral deste composto, o qual apresentou um comportamento dose-resposta típico, eliminando 50% da população de células U87-MG com CC_{50} de $126,44 \pm 11,51 \mu\text{M}$ após 24 horas, conforme mostrado na figura 5A e Tabela 1. Este comportamento se manteve após 72 horas de incubação, como mostrado na figura 5B, em tal período a CC_{50} estimada foi de $31,87 \pm 6,06 \mu\text{M}$.

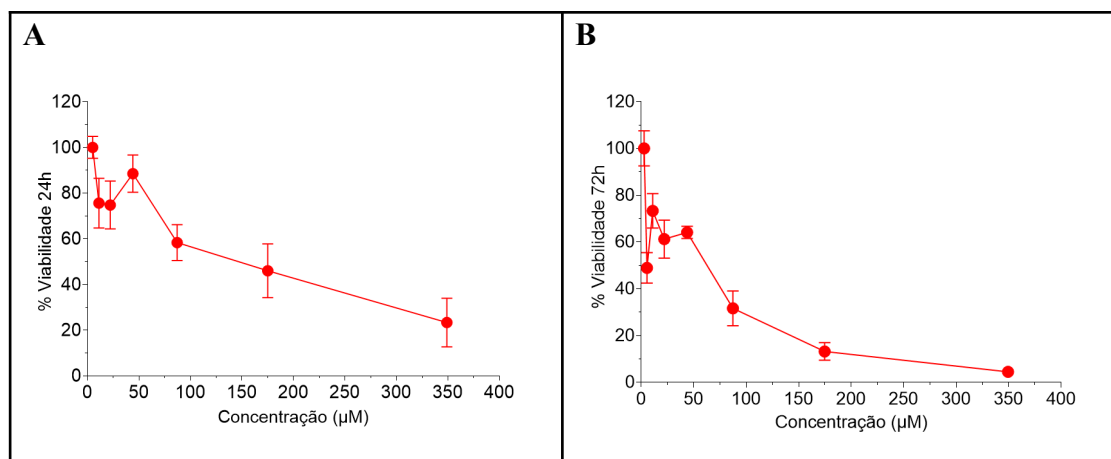


Figura 5 – Células U87-MG (2×10^5 células/mL) foram incubadas com diferentes concentrações de luteolina (5 a 400 μM) durante 24h (A) ou 72h (B). Após este período a viabilidade celular foi mensurada e curvas dose-resposta construídas. Os resultados foram expressos como a média e desvio padrão de ao menos três experimentos independentes, feitos em triplicata.

A luteolina tem recebido destaque na literatura devido suas atividades biológicas. Tsai e colaboradores (2013) demonstraram, através de ensaios *in vitro*, a

ação antitumoral da luteolina, isolada da planta *Glossogyne tenuifolia*, em células tumorais da linhagem U87-MG, em concentrações que variam de 0 a 52,5 μM , por 24, 48 e 72 horas. Neste estudo, observou-se uma redução da viabilidade conforme o aumento da concentração e do tempo, assim como a potencialização dos efeitos antitumorais desse flavonoide ao longo do tempo, induzindo, significativamente, a morte das células tumorais. Souza e colaboradores (2018) observaram que a luteolina, isolado de *Achryrocline satureioides*, provocou redução da proliferação das células tumorais da linhagem U87-MG, em concentrações que variam de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$, a 72 horas, sugerindo que em concentrações mais altas do que as utilizadas neste trabalho, a luteolina também apresenta citotoxicidade significativa capaz de matar e evitar a proliferação de células tumorais da linhagem U87-MG. Ademais, Wang e seus colaboradores (2017) realizaram um estudo *in vitro* que avaliou os efeitos da luteolina comercial em células U87-MG, com concentrações variando de 0 a 80 μM , por 48 horas e demonstraram um comportamento de dose resposta típico com relação à viabilidade celular tumoral, sugerindo que o comportamento observado no presente trabalho a 24 e 72 horas, também foi manifestado após 48h.

Ademais, existem evidências que a luteolina apresentou atividades antitumorais e anti proliferativas contra diversas linhagens de células cancerígenas, como câncer de próstata, tireóide, pâncreas, mama, pulmão (TSAI et al, 2013; TSAI et al, 2016), além de exercer efeitos antitumorais em outras linhagens de glioblastomas, como a U251 (SOUZA et al, 2018; WANG et al, 2017).

No que se refere aos testes com a 3-O-metil-quercetina, observou-se, também, uma atividade dose-resposta típico a 24h (Figura 6A), sendo a CC_{50} estimada a 24h de $325,01 \pm 13,13 \mu\text{M}$ (Tabela 1). Após 72 horas de incubação (Figura 6B), o padrão do comportamento dose-resposta permaneceu e se potencializou, considerando que a CC_{50} estimada para este composto foi de $35,24 \pm 2,77 \mu\text{M}$ (Tabela 1).

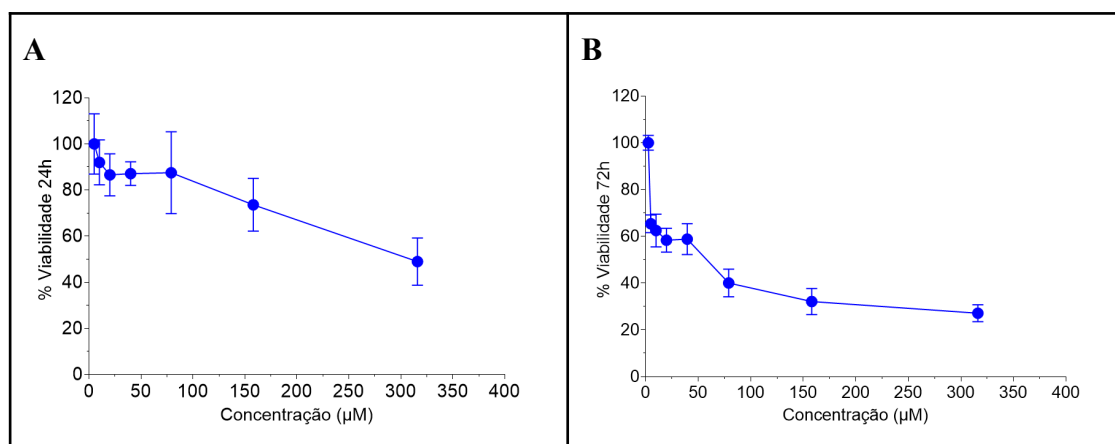


Figura 6 - Células U87-MG (2×10^5 células/mL) foram incubadas com diferentes concentrações de 3-O-metilquercetina (5 a 400 μM) durante 24h (A) ou 72h (B). Após este período a viabilidade celular foi mensurada e curvas dose-resposta construídas. Os resultados foram expressos como a média e desvio padrão de ao menos três experimentos independentes, feitos em triplicata.

Os estudos que relacionam a 3-O-metilquercetina com os glioblastomas, principalmente com linhagem U87-MG, são escassos, porém diversos trabalhos foram e vêm sendo realizados com compostos similares à esse flavonoide, como a quercetina, demonstrando a atividade antitumoral desse composto em células U87-MG, podendo ser utilizada como uma comparação aos efeitos da 3-O-metilquercetina. Em seu estudo, Souza e colaboradores (2018), utilizaram, a quercetina e a 3-O-metilquercetina, isolados de *Achryrocline satureioides*, com concentrações variando de 0 a 1580,92 μM , por 72 horas, em células U87-MG. Após esse período, foi observado a redução da proliferação celular nas concentrações de 515,06 a 1580,92 μM , o que pode indicar uma ação antitumoral, também, em maiores concentrações, assim como a ação da luteolina demonstrada neste mesmo estudo. Adicionalmente, Pan e seus colaboradores (2015) utilizaram células U87-MG, que foram expostas a testes com quercetina, adquirida comercialmente, e similar à 3-O-metilquercetina, em concentrações variando de 50 a 200 μM por 48 e 72h. Neste estudo, foi observado que após 72 horas, houve uma redução da viabilidade celular conforme o aumento da concentração, indicando a potencialização do efeito ao longo do tempo, além da indução a apoptose, assim como foi observado nos testes realizados com a 3-O-metilquercetina no presente trabalho. Ademais, Amstalden (2011) realizou um estudo utilizando a linhagem U87-MG exposta a diferentes concentrações de

quercetina comercial de 5 a 100 μM , em 24, 48 e 72 horas. Neste estudo, foi observado a redução da viabilidade celular ao longo do tempo, apresentando um comportamento dose-resposta típico, ocorrendo uma potencialização após 72 horas, assim como foi demonstrado com a 3-O-metilquercetina no presente trabalho. Ademais, no estudo realizado por Amstalden, em 24h, a viabilidade celular apresentou uma redução de 20% na maior concentração de quercetina (100 μM) enquanto no nosso trabalho, a 24h, a viabilidade celular apresentou uma redução de, aproximadamente, 50% na mesma concentração (100 μM). Em 72h, a quercetina, no estudo de Amstalden, apresentou uma redução de 63% da viabilidade (100 μM), enquanto a 3-O-metilquercetina apresentou uma redução de 75% a 100 μM . Portanto, a 3-O-metilquercetina apresentou maior redução da viabilidade celular tumoral, sugerindo que esse flavonóide pode ser uma alternativa mais eficiente do que a quercetina em tratamentos contra glioblastoma.

Além disso, diversos estudos demonstraram a atividade antitumoral do flavonoide 3-O-metilquercetina em diferentes tipos de câncer, como em câncer de mama, colorretal e melanoma (BIANCHI et al, 2020; HAN et al, 2025; DONEDA et al, 2021; TALIB, ZARGA & MAHASNEH, 2012).

As curvas dos testes antitumorais com o flavonoide velutina também apresentaram um comportamento dose-resposta típico em 24 horas (Figura 5A) e 72 horas (Figura 7B), com CC_{50} de $279,83 \pm 2,80 \mu\text{M}$ e $89,82 \pm 3,58 \mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 1), demonstrando uma atividade antitumoral progressiva.

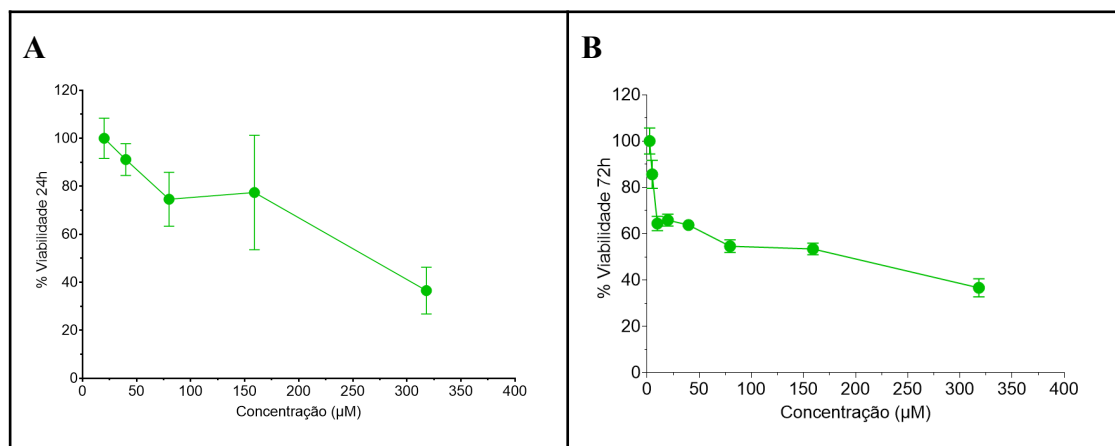


Figura 7 - Células U87-MG (2×10^5 células/mL) foram incubadas com diferentes concentrações de velutina (5 a 400 μM) durante 24h (A) ou 72h (B). Após este período a viabilidade celular foi mensurada e curvas dose-resposta construídas. Os resultados foram expressos como a média e desvio padrão de ao menos três experimentos independentes, feitos em triplicata.

Na literatura, a quantidade de estudos que avaliam as propriedades e potenciais antitumorais da velutina em glioblastomas são muito limitadas, sendo ainda mais escassos se comparado com os trabalhos acerca da 3-O-metilquercetina, sendo que a maioria dos estudos abordam outras propriedades, como as anti inflamatórias.

Ademais, apesar da escassez de estudos acerca da atividade antitumoral da velutina em células da linhagem U87-MG, alguns estudos demonstraram suas propriedades antitumorais e anti-proliferativas contra outros tipos de câncer, como câncer de rim, fígado, cólon, leucemia (RAMOS et al, 2019; MO et al, 2023; DELNAVAZI et al, 2018), além de propriedades anti-inflamatórias (XIE et al, 2012). Esses dados indicam que a velutina possui um potencial para atividades antitumorais visto em outros tipos de câncer, o que sugere que esse composto pode manifestar esse efeito em outras linhagens tumorais, como a U87-MG, como demonstrado no presente trabalho.

Comparativamente, observou-se que a velutina apresentou viabilidade celular menor que a TMZ, após 24 horas, e foi observado a potencialização da citotoxicidade,

após 72 horas. No que diz respeito aos ensaios funcionais, foi possível constatar que a velutina induz morte celular através de apoptose recente e necrose, sendo o único composto, entre os avaliados, que utiliza a necrose como via de morte celular, além de aumentar significativamente a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs). A morte celular induzida por necrose é uma desvantagem no tratamento de tumores, sobretudo no sistema nervoso central, já que este processo de morte pode causar inflamação e destruição tecidual (CURTIN, DONOVAN & COTTER, 2002).

Em relação ao quimioterápico temozolomida (TMZ), notou-se uma atividade dose-resposta típica, com CC_{50} de $1447,69 \pm 19,85 \mu M$ a 24 horas (Figura 6A, Tabela 3). Este comportamento foi potencializado após 72 horas de incubação, conforme demonstrado pela CC_{50} que foi de $611,37 \pm 8,61 \mu M$ (Figura 6B e Tabela 3).

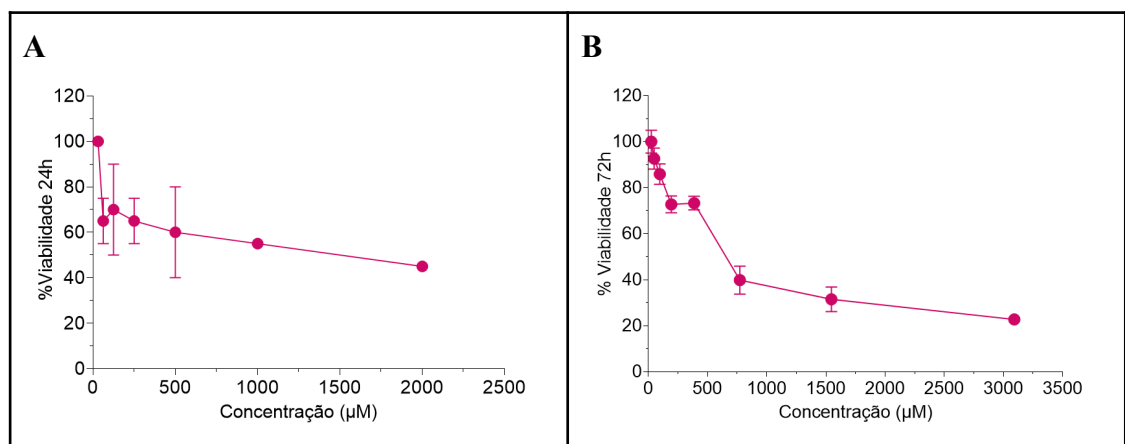


Figura 8 - Células U87-MG (2×10^5 células/mL) foram incubadas com diferentes concentrações de TMZ, 31,25 a 2000 μM e 24,14 a 3090,39 μM , durante 24h (A) ou 72h (B), respectivamente. Após este período a viabilidade celular foi mensurada e curvas dose-resposta construídas. Os resultados foram expressos como a média e desvio padrão de ao menos três experimentos independentes, feitos em duplicata.

A temozolomida (TMZ) é o principal quimioterápico utilizado na terapia de glioblastomas e, frequentemente, associado à radioterapia, visando o aumento da sobrevida dos pacientes. Nesse contexto, Borhani e seus colaboradores (2017) avaliaram a ação antitumoral da TMZ em células da linhagem U87-MG, em concentrações variando de 1000 a 8000 μM , por 24, 48 e 72 horas. Neste estudo, foi observado que, a 24h, houve uma redução da viabilidade celular conforme o aumento das concentrações, assim como foi observado no presente trabalho, porém a 72h,

Borhani e colaboradores observaram uma redução da citotoxicidade da TMZ, o que não ocorreu no nosso trabalho.

Tabela 1 - Valores da concentração citotóxica a 50% (CC₅₀) foram calculados para a linhagem U87-MG, incubada com os flavonoides luteolina, 3-O-metil-quercetina e velutina e TMZ por 24 e 72 horas. A CC₅₀ foi estimada e expressa como a média ± erro padrão.

Compostos	CC₅₀ (µM)	
	24 horas	72 horas
Luteolina	126,44 ± 11,51	31,87 ± 6,06
3-O-metilquercetina	325,01 ± 13,13	35,24 ± 2,77
Velutina	279,07 ± 2,80	89,82 ± 3,58
TMZ	1447,69 ± 19,85	611,37 ± 8,61

Comparativamente à TMZ, observou-se que a luteolina, a 24 horas, apresentou um valor de CC₅₀ 11 vezes menor, enquanto a velutina obteve uma CC₅₀ 5 vezes menor e a 3-O-metilquercetina apresentou uma CC₅₀ 4,45 vezes menor. Sendo assim, a luteolina foi o composto que apresentou maior citotoxicidade, seguida pela velutina e pela 3-O-metilquercetina, em relação à temozolomida (TMZ). Com relação aos tratamentos a 72 h, todos os compostos mostraram ser mais eficazes e mais potentes que a TMZ, apresentando uma potencialização dos efeitos dos flavonoides após esse período. Nesse contexto, após 72 horas, a luteolina apresentou uma atividade 19 vezes maior, a 3-O-metilquercetina obteve uma atividade 17 vezes maior e por fim, a velutina com atividade 6 vezes maior se comparada com a TMZ.

4.2. Ensaio funcionais

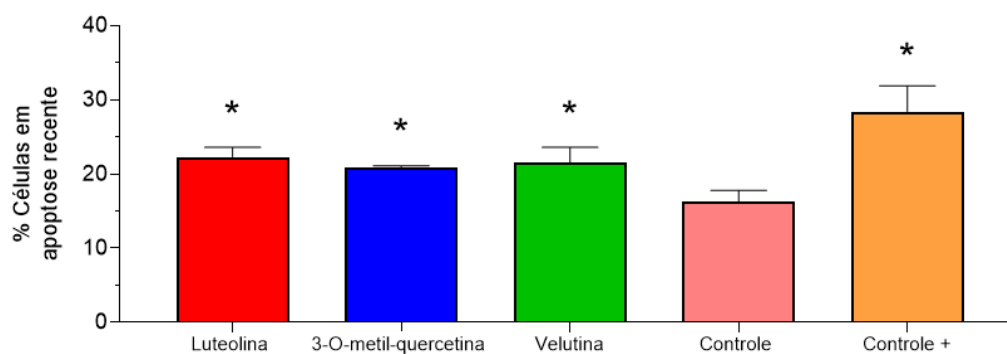
4.2.1. Avaliação da apoptose em células U87 incubadas com os flavonoides

Em relação ao ensaio funcional de apoptose em células tumorais da linhagem U87-MG, foi observado um aumento significativo na população de células em apoptose recente em todos os tratamentos efetuados. Nos testes com a luteolina, foi observado 22,3% da população de células em apoptose recente, 20,9% nos testes com a 3-O-metilquercetina, 21,5% com a velutina e 28,4% no controle positivo em relação ao controle ($p < 0,05$), como mostrado nas figuras 9A e 10.

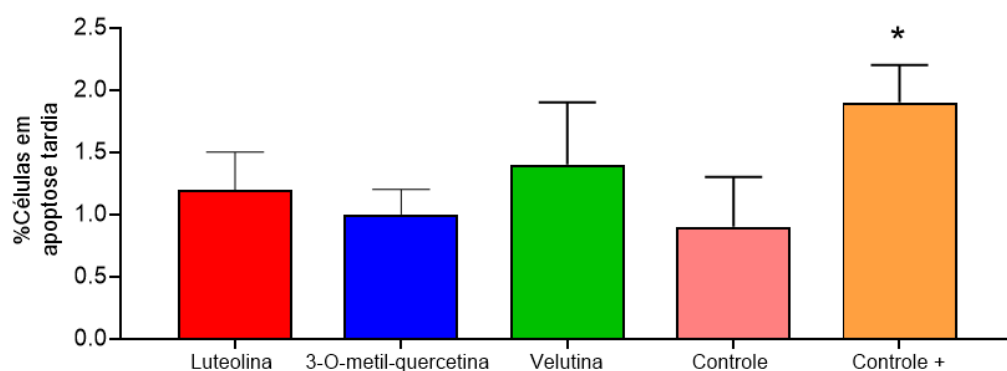
Com relação à apoptose tardia, não foi observado uma diferença significativa entre as células controle e as tratadas com os flavonoides. As células tratadas com peróxido de hidrogênio apresentaram uma maior frequência de células em apoptose tardia (~ 2% da população estudada) em comparação com o controle ($p < 0,05$), apresentado pelas figuras 9B e 10.

No que diz respeito à necrose, apenas observou-se aumento significativo na população de células necróticas apenas no tratamento efetuado com velutina (0.8% da população) e no controle positivo (0.6% de células necróticas) em relação ao controle ($p < 0,05$), como apresentado nas figuras 9C e 10.

A



B



C

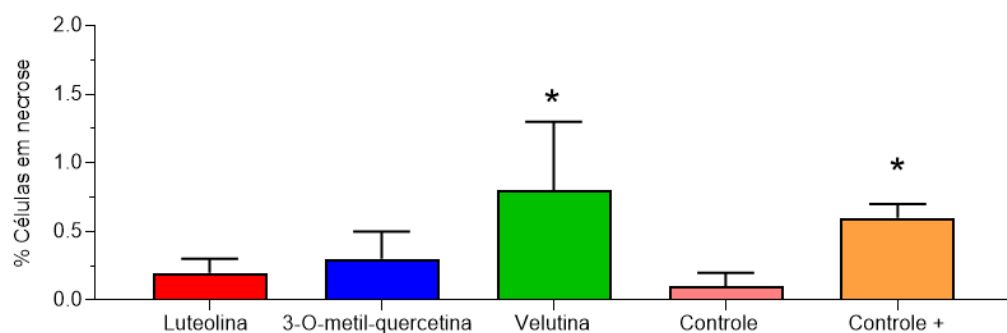


Figura 9 - Células tumorais da linhagem U87 foram incubadas por 24h com a CC₅₀ da luteolina, 3-O-metilquercetina e velutina isolados das folhas de *Vernonanthura tweedieana*. O controle positivo foi constituído por células incubadas com 2,02 µM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o controle foi constituído por células incubadas apenas com meio DMEM. Após esse período, as células foram marcadas com Anexina V e PI para determinar frequência de células em apoptose recente, apoptose tardia ou necrose. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. *p<0,05 em relação ao controle.

A figura 10 representa os *dotplots* ilustrativos referentes ao estudo de apoptose das células U87-MG tratadas com as respectivas CC50s dos flavonoides luteolina, 3-O-metilquercetina, velutina, peróxido de hidrogênio e células controle (figura 10A - E, respectivamente).

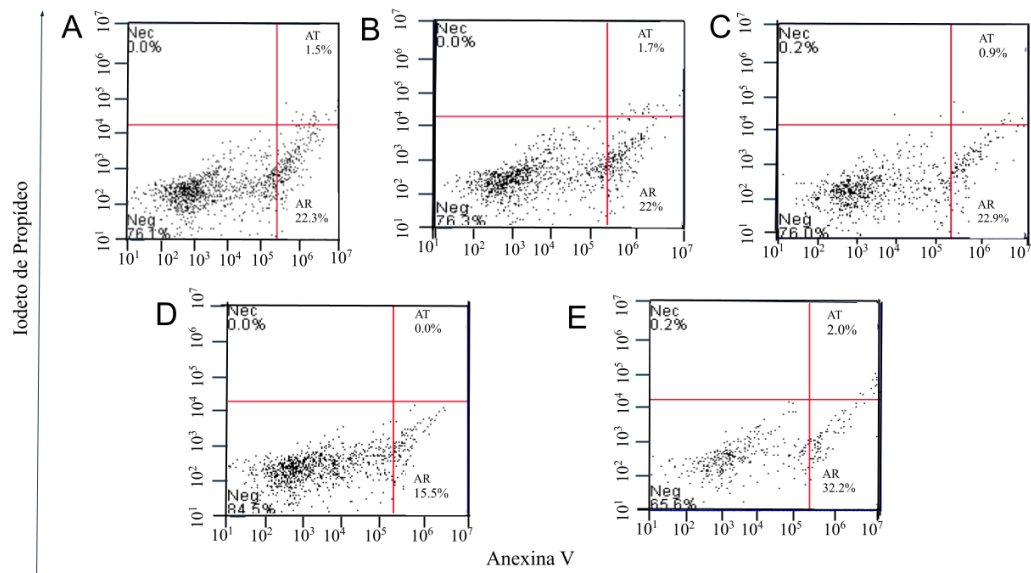


Figura 10 – Células tumorais da linhagem U87-MG foram incubadas por 24h com a CC₅₀ da luteolina (A), 3-O-metilquercetina (B) e velutina (C) isolados das folhas de *Vernonanthura tweedieana*. O controle positivo (F) foi constituído por células incubadas com 2,02 μM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o controle (E) foi constituído por células incubadas apenas com meio DMEM. Estas células foram marcadas com Anexina V e iodeto de propídeo, e então submetidas à citometria de fluxo para caracterização da população de células em apoptose recente (AR), em apoptose tardia (AT) e necrose (Nec).

Nesse contexto, a apoptose é um processo de morte celular fundamental no que diz respeito ao câncer, já que esse fenômeno ocorre individualmente, sem provocar a morte de células adjacentes (ANAZETTI & MELO, 2007). Assim, com o conhecimento acerca do processo de apoptose, é possível aumentar a eficácia dos tratamentos (ANAZETTI & MELO, 2007). Por outro lado, a morte celular por necrose resulta na liberação do conteúdo contido na célula, gerando uma resposta inflamatória e, consequentemente, morte de células adjacentes (CURTIN, DONOVAN & COTTER, 2002).

No estudo realizado por Wang e seus colaboradores (2017) foi observado que a luteolina induziu apoptose através do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da disfunção mitocondrial nas células tumorais, o que não foi observado no presente trabalho já que não apresentou diferença significativa nos ensaios de EROs e potencial de membrana mitocondrial ($p > 0,005$).

Em relação aos mecanismos de morte celular induzido por 3-O-metilquercetina, foi observada a indução de apoptose recente das células tumorais, além de aumentar significativamente as espécies reativas de oxigênio (EROs), sugerindo que essas são as principais vias de morte celular consequentes da ação antitumoral do composto. Bianchi (2018) observou em seu estudo que a 3-O-metilquercetina, isolada de *Achyrocline satureioides*, induziu apoptose em células tumorais da linhagem MDA-MB-231, de câncer de mama, em concentrações de 10, 25 e 50 μM . Além disso, Doneda e colaboradores (2021) demonstraram que a 3-O-metilquercetina também induziu apoptose em células de diferentes linhagens de melanoma. Assim, esses dados demonstram a capacidade desse flavonoide de induzir morte celular programada em diversas linhagens de diferentes tipos de câncer, o que pode indicar que esse composto também possui potencial de induzir apoptose em linhagens tumorais de glioblastoma, como foi demonstrado neste trabalho.

No estudo de Mo e colaboradores (2023) foi realizado testes antitumorais utilizando uma fração purificada das folhas de *Cyclocarya paliurus* e que era enriquecida em flavonoides, sendo um deles a velutina. Em linhagens de tumor de fígado, HepG2, observou-se que a fração era capaz de induzir apoptose em tais células tumorais, controlando o seu crescimento. Além disso, vale ressaltar que a velutina é estruturalmente similar à luteolina, diferindo apenas pela presença de dois radicais metila na velutina, sugerindo um mecanismo biológico-estrutural similar sob as células U87-MG. Dessa forma, sugere-se que a velutina também tem a capacidade de induzir morte celular programada nesta linhagem tumoral.

Portanto, compostos que induzem apoptose, como a luteolina e 3-O-metilquercetina, são mais favoráveis e preferidos se comparados com os que induzem necrose, como a velutina, já que a resposta imunológica para a apoptose é menos nociva.

6.2.2. Espécies reativas de oxigênio (EROS)

Observou-se que o controle, constituído por células cultivadas apenas com meio DMEM, produziu, fisiologicamente, 100 unidades de EROs. Por outro lado, observou-se que todos os tratamentos, exceto aquele efetuado com luteolina, levaram a um aumento significativo de espécies reativas de oxigênio nas células tumorais em comparação ao controle ($p < 0,05$). Nesse contexto, com relação ao controle, o tratamento com 3-O-metilquercetina apresentou, fisiologicamente, 118 unidades de EROs, apresentando um aumento de 1,18 vezes maior, enquanto o tratamento com velutina apresentou 151 unidades de EROs, com um aumento de 1,5 vezes maior e o controle positivo, com 217 unidades de EROs, apresentou um aumento de 2,17 vezes maior (Figura 11).

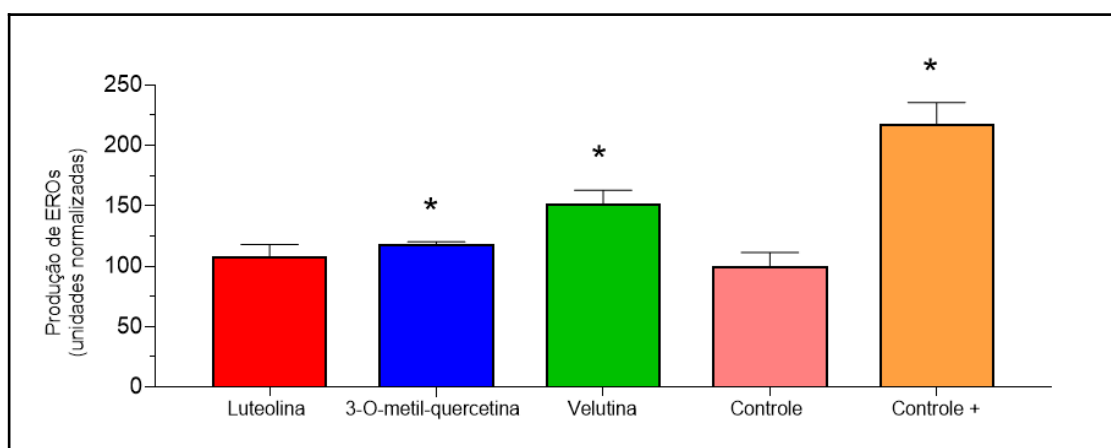


Figura 11 - Células tumorais da linhagem U87 foram incubadas por 24h com a CC_{50} da luteolina, 3-O-metilquercetina e velutina isolados das folhas de *Vernonanthura tweedieana*. O controle positivo foi constituído por células incubadas com $2,02 \mu\text{M}$ de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o controle foi constituído por células incubadas apenas com meio DMEM. Após esse período, as células foram marcadas com CM-H2DCFDA para determinar frequência de células em apoptose recente, apoptose tardia ou necrose. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Han e seus colaboradores (2025) realizaram um estudo utilizando diversos flavonoides de maneira comercial, inclusive a 3-O-metilquercetina e a luteolina, em testes com células de câncer colorretal em 72h. Nesses testes, foi observado que a luteolina aumentou a quantidade de EROs após esse período, o que não ocorreu no

nosso trabalho. Neste mesmo estudo, com relação à 3-O-metilquercetina, não foi observado o aumento de EROs após 72 horas, porém houve alteração do potencial de membrana mitocondrial, o que também não ocorreu no nosso trabalho, no qual a 3-O-metilquercetina aumentou significativamente o nível de EROs, indicando que esses mecanismos de morte celular podem estar relacionados com o tempo de exposição. Já a velutina, também apresentou um aumento significativo da quantidade de EROs, indicando que a indução da morte celular através do estresse oxidativo.

6.2.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

As mitocôndrias das células incubadas com a CC₅₀ da luteolina, 3-O-Metil quercetina ou velutina não apresentaram alteração do potencial de membrana mitocondrial em relação ao controle, sugerindo que tais compostos não atuam na mitocôndria. Por outro lado, o controle positivo apresentou inibição do potencial de membrana mitocondrial.

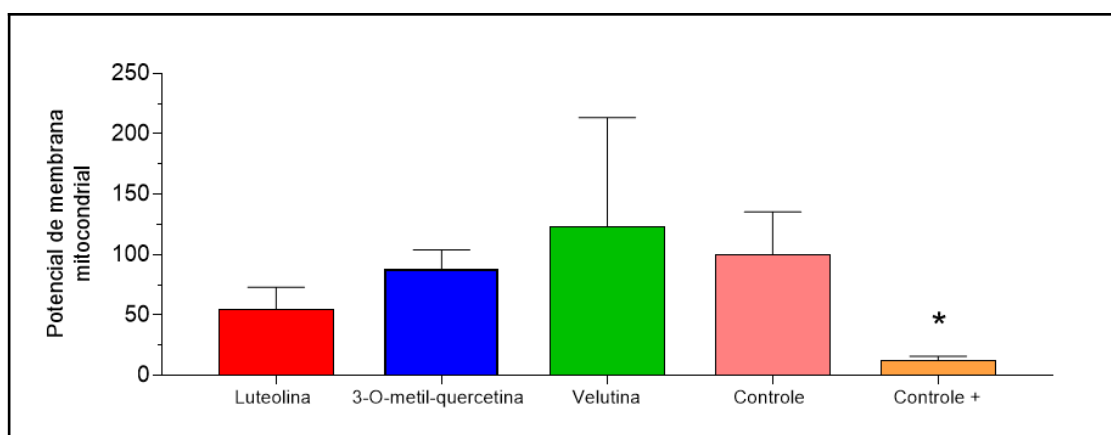


Figura 12 - Células tumorais da linhagem U87 foram incubadas por 24h com a CC₅₀ da luteolina, 3-O-metilquercetina e velutina isolados das folhas de *Vernonanthura tweedieana*. O controle positivo foi constituído por células incubadas com 2,02 µM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o controle foi constituído por células incubadas apenas com meio DMEM. Após esse período, as células foram marcadas com Mitotracker Green FM. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. *p<0,05 em relação ao controle.

5. CONCLUSÃO

Em vista dos resultados, os flavonoides avaliados apresentaram atividade antitumoral significativa e representam potenciais alternativas para o desenvolvimento de novas terapias contra os glioblastomas.

Nesse contexto, os resultados demonstraram que os flavonoides luteolina, 3-O-metilquercetina e velutina, isolados da planta *Vernonanthura tweedieana*, apresentaram atividade antitumoral *in vitro* contra a linhagem U87-MG de glioblastoma, sendo que a luteolina se destacou devido sua maior citotoxicidade em comparação à temozolomida (TMZ). Os flavonoides 3-O-metilquercetina e velutina também apresentaram citotoxicidade e atividade antitumoral, o que sugere que, também, são potenciais terapêuticos promissores para a linhagem U87-MG de glioblastomas.

Os ensaios funcionais indicaram que todos os compostos induziram apoptose recente nas células tumorais como mecanismo de morte celular, o que é uma característica importante, já que as células tumorais tendem a possuir resistência à apoptose. Além disso, a 3-O-metilquercetina e a velutina aumentaram os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode indicar o início do processo de apoptose. Por outro lado, nenhum dos compostos induziu, significativamente, morte celular através da alteração do potencial de membrana mitocondrial.

Portanto, os flavonoides luteolina 3-O-metilquercetina e velutina, isolados de *Vernonanthura tweedieana*, são compostos promissores para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra os glioblastomas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARONI, A. & GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, p. 239-244. 2011.
- AHMED, S. et al. Novel anti-hepatitis B virus flavonoids sakuranetin and velutin from *Rhus retinorrhoea*. *Molecular Medicine Reports*, v. 28. 2023.
- ALIFIERIS, C. & TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 152, n. 63-82. ago.2015.
- AMSTALDEN, H. G. Efeitos da Quercetina em Células de Glioma humano: Envolvimento de metaloproteinases de matriz e seus inibidores. 2011.
- ANAZETTI, M. C. & MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa*, v. 1, p. 37-58. 2007.
- ASIGBAASE, M. et al. Conservation and economic benefits of medicinal plants: Insights from forest-fringe communities of Southwestern Ghana. *Trees, Forests and People*, v.14. dez. 2023.
- BIANCHI, S. E. et al. *Achyrocline satureioides* compounds, achyrobichalcone and 3-O-methylquercetin, induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human breast cancer cell lines. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 72, p. 2133-2145. 2020.
- BIANCHI, S. E. Isolamento de achyrobichalcona e 3-O-metilquercetina a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides* utilizando cromatografia em contracorrente de alta performance (HPCCC) e avaliação do potencial citotóxico in vitro em linhagem de câncer de mama MDA-MB-231. 2018.
- BOCSO, N. B. & BUTNARIU, M. The biological role of primary and secondary plants metabolites. *Journal of Nutrition and Food Processing*, v. 5. 2022.
- BOOKER, A., JOHNSTON, D & HEINRICH, M. Value chains of herbal medicines—Research needs and key challenges in the context of ethnopharmacology. Elsevier BV, V. 140. 2012.
- BORGES, L. P. & AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. *Revista Agrotecnologia*, v. 11, p. 54-67. 2020.
- BORHANI, S. et al. In Vitro Radiosensitizing Effects of Temozolomide on U87MG Cell Lines of Human Glioblastoma Multiforme. *Iran J. Med. Sci*, v. 42. 2017.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, v.74, n.229-263. abr. 2024.

BROWN, J. S. et al. Updating the Definition of Cancer. American Association for Cancer Research, v. 21(11), n. 1142-1147. nov. 2023.

CHERNIESKI, D. Avaliação da Atividade Antitumoral *in vitro* de compostos purificados da alga vermelha *Laurencia aldingensis* em glioblastoma. 2025.

CURTIN, J. F., DONOVAN, M., COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. Journal of Immunological Methods, v. 265, p. 49-72. 2002.

DELNAVAZI, M. R. et al. Cytotoxic Flavonoids from the Aerial Parts of *Stachys lavandulifolia* Vahl. Pharmaceutical Sciences, v. 24, p. 332-339. 2018.

DIECKMANN, K. U. Radiotherapy of glioblastoma. Memo. 2010.

DONEDA, E. ET AL. 3-O-Methylquercetin from *Achyrocline satureioides*—cytotoxic activity against A375-derived human melanoma cell lines and its incorporation into cyclodextrins-hydrogels for topical administration. Drug Delivery and Translational Research, v. 11, p. 2151-2168. 2021.

DUARTE, M. R. & CHELLA, L. Caracteres anatômicos de folha de *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob., Asteraceae. Visão Acadêmica, v.15, n.1. jan-mar.2014.

GRIVICICH, I., REGNER, A. & ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 53(3), n. 335-343. 2007.

HAN, S. et al. Structure-activity relationship analysis of mono-methylated quercetins by comprehensive MS/MS analysis and anti-proliferative efficacy in human colorectal cancer cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 184. 2025.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, v. 144, p. 646-674. 2011.

HERBENER, V. J. et al. Considering the Experimental Use of Temozolomide in Glioblastoma Research. Biomedicines, v. 8, p. 151. 2020.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. Genes & Diseases, v. 3, p. 198-210. 2016.

MACHADO, I. D. et al. *Vernonanthura tweedieana* (Baker) H. Rob. (Asteraceae), an Ordinary Bush or an Anti-Inflammatory and Immunomodulator Aromatic Species?. Pharmaceuticals, v.17. nov. 2024.

MO, J. et al. The mechanism of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* on inhibiting liver cancer based on *in vitro* experiments and network pharmacology. Frontiers in Pharmacology. 2023.

NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of Nature Products, v. 83, p. 770-803. 2020.

NIJVERDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74, n.418-425. out. 2001.

PAN, C.H. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. *Neurochemistry International*, v. 80, p. 60-71. 2015.

PORTILLO, A. et al. Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, n. 49-52, fev. 2005.

RAMOS, A., V., G. et al. Chemical Constituents, Antiproliferative and Antioxidant Activities of *Vernonanthura nudiflora* (Less.) H. Rob. Aerial Parts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, p. 1728-1740. 2019.

ROBINSON, H. A new genus *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae). *Phytologia*, v. 73, p. 65-76. 1992.

SAN JUAN, B. P. et al. The Complexities of Metastasis. *Cancers*, v. 11, p. 1575. 2019.

SALES, F. S. Avaliação da Atividade Anti-*Trypanosoma cruzi* de metabólitos especializados obtidos de *Vernonanthura polyanthes* (ASTERACEAE). 2023.

SCHWINGEL, L. C. Associação da 3-O-metilquercetina com β -ciclodextrina: Avaliação da Complexação e Penetração Cutânea. 2007.

SOUZA, P. O. et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 51, n. 23-33. set. 2018.

STUPP, R. M. D. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, v. 352. 2005.

SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochem Rev*, v. 19, p. 1199-1209. 2020.

TALIB, W. H., ZARGA, M., H, A., MAHASNEH, A. M. Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*, v. 17, p. 3291-3303. 2012.

TSAI, P. H. et al. Dietary Flavonoids Luteolin and Quercetin Suppressed Cancer Stem Cell Properties and Metastatic Potential of Isolated Prostate Cancer Cells. *Anticancer Research*, v. 36, n. 6367-6380. 2016.

TSAI, Y. D. et al. Luteolin inhibits proliferation of human glioblastoma cells *via* induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 44, n. 6, p. 837-845, nov. 2013.

WANG, K. Dual protective role of velutin against articular cartilage degeneration and subchondral bone loss *via* the p38 signaling pathway in murine osteoarthritis. *Frontiers Endocrinology*, v.13. jul. 2022.

WANG, Q. et al. Luteolin induces apoptosis by ROS/ER stress and mitochondrial dysfunction in gliomablastoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 79, p. 1031-1041, 2017.

XIE, C. et al. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 23, p. 1184-1191. 2012.

YONG, R. L. & LONSER, R. R. Surgery for glioblastoma multiforme: striking a balance. *World Neurosurg*, v. 76. 2011.

ZHANG, J., STEVENS, M. F. G. & BRADSHAW, T. D. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*, v. 5, p. 102-114. 2012.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: ANA LUIZA TONIOLO BOTASSO

Título: "Avaliação da atividade antitumoral in vitro de flavonóides isolados das folhas de *Vernonanthura tweediana* em glioblastoma"

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero	Aprovado
MSC. Diogo Chernieski	APROVADO

PARECER:

A discente apresentou seu trabalho com segurança e total domínio do tema. Foram realizadas pequenas sugestões que poderão ser incorporadas ao trabalho final.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Ana Luiza Toniolo Botasso** obteve o seguinte conceito:



APROVADO



REPROVADO

São Vicente, 02 de julho de 2025.

Luiz Felipe D. Passero
Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

Diogo Chernieski
MSC. Diogo Chernieski