



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



Maitê Vicente

**AVALIAÇÃO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE SEMENTES/BAGAS DE *XILOPIA*
AROMÁTICA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS**

Ouro Preto

2026

Maitê Vicente

**AVALIAÇÃO DE EXTRATO E FRAÇÕES DE SEMENTES/BAGAS DE *XILOPIA*
AROMATICA SOBRE CÉLULAS TUMORAIS**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Glenda Nicioli da Silva

Ouro Preto

2026

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

V632a Vicente, Maitê.

Avaliação de extrato e frações de sementes/bagas de Xilopia aromatica sobre células tumorais. [manuscrito] / Maitê Vicente. - 2026. 40 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

Coorientadora: Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Plantas medicinais. 2. Matéria médica vegetal. 3. Agentes antineoplásicos. 4. Bexiga - Câncer. I. Souza, Gustavo Henrique Bianco de. II. Silva, Glenda Nicioli da. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.3

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - CRB6/2322



FOLHA DE APROVAÇÃO

Maitê Vicente

Avaliação de extrato e frações de sementes/bagas de *Xylopia aromatica* sobre células tumorais

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 28 de abril de 2026

Membros da banca

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza - Orientador - Escola de Farmácia - Universidade Federal de Ouro Preto
Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva - Escola de Farmácia - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira - Escola de Farmácia - Universidade Federal de Ouro Preto
Mestre e Doutoranda Leticia Maria Almeida Morais - CIPHARMA - Escola de Farmácia - Universidade Federal de Ouro Preto

Gustavo Henrique Bianco de Souza, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 28/04/2026



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Bianco de Souza, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 28/04/2026, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1097698** e o código CRC **0D8FB09E**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, de forma especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza, pela condução segura e criteriosa deste trabalho, pela constante disponibilidade e pelas contribuições científicas que foram essenciais para o amadurecimento da pesquisa e para a minha formação acadêmica.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva, registro meu sincero agradecimento pelas valiosas sugestões, pelo olhar atento aos detalhes e pelo apoio técnico-científico ao longo do desenvolvimento do estudo, contribuindo significativamente para a qualidade final do trabalho.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), em especial à gloriosa Escola de Farmácia, agradeço pelo ensino de qualidade e pela sólida formação acadêmica, pelo incentivo à pesquisa e pelas oportunidades que possibilitaram a construção do conhecimento científico ao longo da graduação.

Ao Laboratório de Fitoquímica e ao Grupo de Estudos e Pesquisas Toxicogenéticas, Epidemiológicas e Clínicas (G-TEC), agradeço pela infraestrutura, pelo suporte técnico e pelo ambiente científico colaborativo. Aos colegas desses laboratórios, agradeço pelo apoio cotidiano, pelas orientações práticas e pela colaboração ao longo das etapas experimentais deste trabalho.

Agradeço ainda às agências de fomento CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro indispensável à realização desta pesquisa.

Agradeço à equipe que fez do meu estágio uma experiência de grande aprendizado, pelas trocas de conhecimento e pelas contribuições para minha formação na etapa final da graduação.

Agradeço a Deus pela presença constante ao longo de toda a minha trajetória, pela serenidade, pela proteção e pela confiança que me acompanharam em cada etapa desse caminho.

Aos meus pais, Jeferson e Renata, agradeço por serem base sólida, incentivo diário e exemplo. Pelo apoio incondicional, pelo amor que sustenta e pela confiança depositada em mim desde o início. Cada conquista carrega a educação, o cuidado e os valores que recebi de vocês, e este trabalho é reflexo direto disso. Ao meu irmão, Lucas, agradeço pelo apoio e pela convivência ao longo dessa caminhada.

Deixo também meu agradecimento ao Pedro pelo companheirismo e pela atenção ao longo desse período. Obrigada pelo incentivo, pela compreensão e por tornar esse processo mais leve e significativo.

Aos meus amigos de curso, em especial Lídia, Maria Cecília, Júlia, Letícia, Rafael, André e Thiago, agradeço pelas trocas diárias, pela convivência e pelo apoio ao longo da graduação, que tornaram essa etapa mais rica e significativa.

Às minhas amigas de vida, Ana Júlia, Ana Carolina e Mafê, agradeço pela amizade sincera, pela presença constante e pelo apoio ao longo de toda essa trajetória.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desse caminho, deixo meu sincero agradecimento.

RESUMO

O câncer de bexiga representa um importante problema de saúde pública, caracterizado por alta incidência e recorrência, o que reforça a necessidade de novas alternativas terapêuticas com maior eficácia e menor toxicidade. Nesse contexto, produtos naturais têm sido amplamente investigados devido ao seu potencial biológico. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral do extrato etanólico bruto e de suas frações obtidas a partir de sementes e bagas de *Xylopiya aromataica* frente a linhagens de carcinoma de bexiga. O material vegetal foi submetido à extração por percolação, seguida de fracionamento líquido-líquido, originando as frações hexânica, acetato de etila e butanólica. A caracterização fitoquímica foi realizada por cromatografia em camada delgada, permitindo a detecção de classes de metabólitos secundários como terpenoides, cumarinas, flavonoides e ácidos graxos. A atividade antitumoral foi avaliada por ensaio de viabilidade celular (XTT) nas linhagens tumorais J82 e UMUC3, bem como na linhagem não tumoral MRC5, em diferentes concentrações e tempos de exposição. As frações de acetato de etila e butanólica apresentaram maior redução da viabilidade celular de forma dependente da concentração, sendo selecionadas para determinação da concentração inibitória média (IC₅₀) e do índice de seletividade (IS). Apesar da atividade citotóxica observada, não foi evidenciada seletividade para células tumorais. Alterações morfológicas compatíveis com dano celular e indução de morte celular também foram observadas. Os resultados indicam que a *Xylopiya aromatica* apresenta potencial antitumoral *in vitro*, especialmente nas frações de acetato de etila e butanólica, ressaltando a importância de estudos adicionais de isolamento, caracterização e avaliação mecanística dos compostos bioativos envolvidos.

Palavras-chave: *Xylopiya aromatica*; atividade antitumoral; câncer de bexiga; produtos naturais; citotoxicidade.

ABSTRACT

Bladder cancer represents an important public health issue due to its high incidence and recurrence rates, highlighting the need for new therapeutic alternatives with improved efficacy and reduced toxicity. In this context, natural products have been widely investigated because of their biological potential. The present study aimed to evaluate the antitumor activity of the crude ethanolic extract and fractions obtained from seeds and berries of *Xylopia aromatica* against bladder carcinoma cell lines. The plant material was subjected to percolation extraction, followed by liquid–liquid fractionation, yielding hexane, ethyl acetate and butanolic fractions. Phytochemical characterization was performed by thin-layer chromatography, allowing the detection of secondary metabolite classes such as terpenoids, coumarins, flavonoids and fatty acids. Antitumor activity was assessed by cell viability assay (XTT) in the J82 and UMUC3 tumor cell lines, as well as in the non-tumoral MRC5 cell line, at different concentrations and exposure times. The ethyl acetate and butanolic fractions showed a greater concentration-dependent reduction in cell viability and were selected for determination of the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) and selectivity index (SI). Despite the observed cytotoxic activity, no selectivity toward tumor cells was evidenced. Morphological alterations compatible with cellular damage and induction of cell death were also observed. These findings indicate that *Xylopia aromatica* presents *in vitro* antitumor potential, particularly in the ethyl acetate and butanolic fractions, reinforcing the relevance of further studies focused on the isolation, characterization and mechanistic evaluation of the bioactive compounds involved.

Keywords: *Xylopia aromatica*; antitumor activity; bladder cancer; natural products; cytotoxicity.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	8
1.1 Família Annonaceae e gênero <i>Xylopia</i>	8
1.2 Atividade antitumoral de produto naturais	9
2.JUSTIFICATIVA	11
3.OBJETIVOS	12
3.1 Objetivos Gerais	12
3.2 Objetivos Específicos	12
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1 Coleta do material vegetal.....	12
4.2 Preparo do extrato etanólico bruto (EEB).....	12
4.3 Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB).....	13
4.4 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	14
4.5 Linhagens celulares	15
4.6 Avaliação da atividade antitumoral dos extratos e suas frações	15
4.7 Cálculo da IC ₅₀ e Índice de Seletividade (IS).....	16
4.8 Avaliação da Morfologia Celular	17
4.9 Análise Estatística	17
5.RESULTADOS	18
5.1 Extrações.....	18
5.1.2 Fracionamento a partir do EEB	18
5.2 Cromatografia em Camada Delgada.....	19
5.3 Teste de Citotoxicidade	22
5.4 Cálculo da IC ₅₀ e Índice de Seletividade (IS).....	27
5.4.1 - Linhagem UMUC3	27
5.4.2 - Linhagem J82	28
5.4.3 - Linhagem MRC5	Error! Bookmark not defined.
5.5 Avaliação da morfologia celular	28
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família Annonaceae e gênero *Xylopia*



Foto: Marcelo Kuhlmann.

Figura 1 – Flores, frutos e sementes de *Xylopia aromatica*: À esquerda, flores com pétalas brancas e cálice vermelho-pardos; à direita, frutos em diferentes estágios de maturação, evidenciando a abertura dos folículos e a exposição das sementes ovoides e azuladas.

A *Xylopia aromatica* é uma árvore nativa do cerrado e de fácil identificação. Sua altura varia de 2 a 8 metros, apresenta ramos e folhas pendentes e flores com pétalas brancas e cálice vermelho-pardo; as flores, quando abertas, remetem a estrelas, com pedicelos muito curtos e voltados para cima; seus frutos são comestíveis e apresentam-se vermelhos por ocasião da deiscência e amarronzados ou pretos quando secos podendo ser coletados em qualquer época do ano; as sementes são ovoides, ariladas apicalmente e azuladas por ocasião da deiscência, em média, são encontradas duas a oito sementes por carpídio (Carvalho, 2010). As plantas do gênero *Xylopia* fazem parte de uma das mais abundantes espécies da família Annonaceae. Esta família botânica abrange 2.300 espécies, distribuídas em aproximadamente 130 gêneros carpídio (Carvalho, 2010.). Existem cerca de 150 espécies do gênero *Xylopia* distribuídas nas regiões América do Sul, América central, África e Ásia. No Brasil, existem 32 espécies de *Xylopia* descritas, distribuídas nas cinco regiões do país. Sua utilização vai desde a culinária, sendo consumida como tempero, em função do seu sabor picante, até a comercialização de madeira para construções civis. No entanto, atualmente seu destaque é para a medicina popular, na qual os pacientes fazem uso do chá para curar diversas patologias como febres, hemorroidas,

dores na coluna e até doenças parasitárias. Isso se dá devido às propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes. Estudos de caracterização química já identificaram a presença de alcaloides, esteroides, flavonoides, óleos essenciais, diterpenos e saponinas em frutos de *Xylopia* e, por isso, pode-se dizer que plantas deste gênero representam uma fonte promissora de substâncias bioativas. Na medicina tradicional e popular africana é atribuído aos seus frutos e sementes efeito estimulante, como também para o tratamento de infecções de pele, tosse, febre e diabetes (Oliveira, 2012).

Estudos químicos com os frutos de *X. aromatica* somente avaliaram a presença de terpenos, incluindo monoterpênicos, sesquiterpenos, diterpenos e esteróis. Em plantas de *Xylopia*, já foram identificados também alcaloides do tipo isoquinolinícos em folhas, cascas e frutos. Esteroides também foram identificados em plantas desta espécie, incluindo o estigmasterol em frutos de *X. aromatica*. Nos frutos e folhas deste gênero também já foram identificadas substâncias fenólicas, incluindo flavonoides do tipo quercetina, responsáveis pela ação antioxidante evidenciada em alguns estudos (Oliveira, 2012).

Em relação aos estudos farmacológicos com espécie de *Xylopia*, tem sido atribuído às acetogeninas e alcaloides das folhas e cascas da planta, efeito citotóxico, larvicida e antitumoral *in vitro* (Mesquita, 2009). Foram encontrados estudos farmacológicos e biológicos que avaliassem o potencial citotóxico do caule de *X. aromatica* somente em células de câncer de mama, próstata e pulmão (Sufreddini, 2007). Assim, a ausência de estudos sobre o efeito das sementes e bagas no câncer de bexiga, associada à sua grande abundância no cerrado mineiro e potencial fonte de substâncias bioativas instigam o interesse em avaliar o potencial da semente em um modelo experimental *in vitro* que apresentem respostas antitumorais e alterações metabólicas.

1.2 Atividade antitumoral de produto naturais

A neoplasia maligna é uma condição caracterizada pela sua grande mortalidade, sendo a segunda patologia que mais causa óbitos no mundo. É caracterizada por um crescimento desordenado do tecido em decorrência de uma proliferação anormal das células. São descritas diversas mutações genéticas que estão envolvidas no processo do câncer. Por esse motivo, essas mudanças se tornaram objeto de estudo, pois ocorrem em genes que levam à proliferação celular anormal. O carcinoma de bexiga é a décima primeira neoplasia mais prevalente no âmbito mundial, sendo a 14^a causa de morte associada ao câncer (Globocan, 2022). A prevalência e mortalidade dessa neoplasia é três vezes maior em indivíduos do sexo masculino (Saginala,

2020). No Brasil, o câncer de bexiga se apresenta como a 12^a neoplasia mais comum (INCA, 2023).

Diversos são os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do câncer de bexiga, como a predisposição genética e a exposição ambiental, e uma complexa interação entre esses fatores pode propiciar o surgimento e a progressão tumoral (Mushtaq, 2019). O principal fator de risco ambiental relacionado ao desenvolvimento do carcinoma de bexiga é o tabagismo (Zhang, 2021). A fumaça do tabaco possui inúmeras substâncias carcinogênicas, que ao serem metabolizadas, entram em contato e causam toxicidade a bexiga urinária (Al-Zalabani, 2016). Outro fator de risco importante é a exposição crônica a carcinógenos, dentre eles, as aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo a segunda maior causa de câncer de bexiga (Mushtaq, 2019). Além disso, a redução da habilidade de reparo do DNA, associada ao processo natural de envelhecimento também é um fator associado ao desenvolvimento desse carcinoma (Lenis, 2020). A herança genética está associada a aproximadamente 7% dos casos de câncer de bexiga (Mushtaq, 2019).

Atualmente, o diagnóstico clínico mais realizado é a cistoscopia com citologia urinária, além da utilização de biomarcadores e da tomografia computadorizada (Hu, 2022). O diagnóstico precoce, principalmente antes que ocorra a invasão muscular, corrobora para um tratamento efetivo, podendo ser controlada com efeito mínimos na sobrevivência (Tran, 2021). A hematúria indolor visível ou não visível, comumente detectado no exame de sangue, é o principal sintoma associado ao câncer de bexiga, ocorrendo em cerca de 75% dos casos de pacientes com este carcinoma (Khandhour, 2021).

Os esquemas terapêuticos mais utilizados para o tratamento do câncer de bexiga são a combinação de metotrexato, vimblastina, doxorrubicina e cisplatina (M-VAC), bem como a 10 combinação de gencitabina e cisplatina (GC) (Tran, 2021). O protocolo GC demonstrou maior eficácia, melhor segurança e tolerabilidade em comparação com M-VAC, além de reduzir significativamente a neutropenia, um dos efeitos colaterais relevantes na quimioterapia (Tran, 2018). Dessa forma, verifica-se que os protocolos quimioterápicos atualmente empregados estão associados a diversos efeitos adversos sistêmicos, os quais podem comprometer a adesão ao tratamento, impactar negativamente o sucesso terapêutico e influenciar a sobrevida dos pacientes submetidos a essas terapias.

Com a evolução de técnicas de cultura celular e tecnologias que ampliaram as pesquisas relacionadas à atividade antitumoral, ocorreu um aumento significativo do conhecimento relacionado ao desenvolvimento e progressão do câncer, levando a um maior discernimento dos processos e mecanismos envolvidos. Linhagens celulares de câncer imortalizadas são

comumente utilizadas para avaliar os mecanismos selecionados na sua proliferação celular, como também analisar fármacos antitumorais e produtos naturais que ajudem na interrupção do desenvolvimento do câncer. Na atualidade, uma variedade de compostos foi testada com o intuito de combater o câncer, como os terpenos, alcaloides, cumarinas, lignanas, flavonoides, taninos, estilbenos, curcuminoides e polissacarídeo. Compostos naturais com potencial atividade antitumoral tem sido amplamente pesquisados para avaliar seus efeitos sobre tumores e, desse modo, abrir caminhos para futuros estudos que identificarão através de quais mecanismos esses compostos atuam.

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que os diversos tipos de câncer estão entre os principais problemas de saúde pública, e os carcinomas uroteliais merecem destaque uma vez que representam uma das neoplasias de maior recorrência e conseqüentemente, maior custo para o sistema de saúde. No entanto, os mecanismos que levam à recorrência dessa neoplasia permanecem desconhecidos. Além disso, a toxicidade e efeitos colaterais de drogas sintéticas vem sendo apontados como um obstáculo nos tratamentos. Logo, torna-se necessário que estudos que buscam novas alternativas de tratamento, como os fitoterápicos sejam realizados. Estudos tem demonstrado que extratos contendo alcaloides, flavonoides, terpenos e esteroides apresentam atividade antitumoral, tanto no tratamento em si, como na prevenção de tumores (Silva, 2015). Esse fato destaca a importância de pesquisas envolvendo plantas medicinais, como a espécie *X. aromatica*, por conter metabólitos secundários das classes químicas citadas acima.

Os flavonoides têm sido caracterizados como inibidores de células cancerosas, por apresentarem propriedades farmacológicas conhecidas como antioxidantes, possivelmente controlando assim a proliferação celular e desempenhando o bloqueio da oncogênese por mecanismos que modulam enzimas da via metabólica carcinogênica (Santos, 2017). Os alcaloides tem como possíveis mecanismos de ação a capacidade de interação com ácidos nucleicos, principalmente DNA (Bertola, 2014), demonstrando efeitos citotóxicos relacionados ao acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), efeitos pró-apoptóticos relacionados com disfunção mitocondrial e aumento da clivagem de PARP, todas essas ações foram comprovadas *in vitro*.

O grupo dos terpenos tem como principais mecanismos de ação a indução da apoptose e da necrose, o que tem como consequência a parada do ciclo celular, tendo então efeito antiproliferativo.

Por fim, a classe dos esteroides também tem grande importância pois agem por meio de receptores nucleares e conseguem alterar o nível de expressão de genes específicos.

As espécies do gênero *Xylopi*a são utilizadas no tratamento de diversas enfermidades, entretanto existem poucos relatos na literatura sobre a comprovação de atividades farmacológicas de *X. arom*atica. Neste sentido, este estudo tem como proposta avaliar o potencial antitumoral dos extratos etanólicos e suas frações frente as linhagens de células uroteliais de maior incidência de carcinoma de bexiga J82 e MUC3. Assim, este estudo poderá contribuir para um melhor entendimento do funcionamento da *X. arom*atica, para essa atividade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar a atividade antitumoral dos extratos etanólicos brutos e frações de sementes e bagas de *Xylopi*a *arom*atica.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar os extratos etanólicos brutos;
- Fracionar os extratos etanólico brutos;
- Avaliar a atividade antiproliferativa e citotóxica dos extratos etanólicos bruto e suas frações frente a linhagens de células de carcinoma de bexiga (J82 e UMUC3).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

O material vegetal utilizado, sementes com bagas de *Xylopi*a *arom*atica, foi adquirido por doação de produtor da região de Furquim, Estado de Minas Gerais, e pelo Projeto “Plantas Medicinais e úteis da Bacia do Rio Doce”, coordenado pelo Prof. Dr. Alberto José Cavaliheiro (IQ-UNESP-Ar), chamada CAPES-FAPEMIG-FAPES-CNPq-ANA 06/2016. Esse material foi submetido a processo de secagem em estufa de ar circulante, 50 °C, com posterior trituração, até o estado de pó fino, em moinho de facas.

4.2 Preparo do extrato etanólico bruto (EEB)

Esse material vegetal triturado foi submetido à extração por percolação com etanol (80%), à temperatura ambiente. Em seguida, após esgotamento da droga, o extrato foi levado

ao rotaevaporador, em temperatura não superior a 50 °C, obtendo o extrato etanólico bruto (EEB).

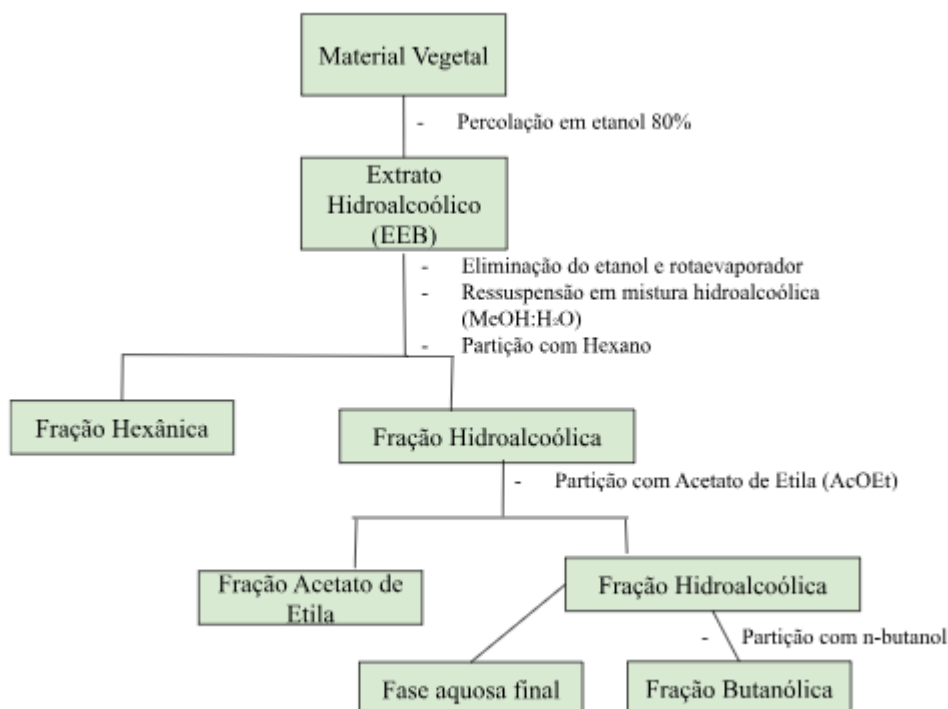
4.3 Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB)

Para a obtenção das frações, o EEB foi suspenso em MeOH:H₂O (8:2), e submetido a partição líquido-líquido em funil de separação com hexano, obtendo-se uma fração hexânica e uma fração hidroalcoólica. Posteriormente, a fração hidroalcoólica foi submetida a nova partição líquido-líquido em funil de separação com acetato de etila (AcOEt), obtendo-se novamente uma fração hidroalcoólica e uma fração acetato etilênica. Por fim, esta fase hidroalcoólica foi submetida à extração líquido-líquido com n-butanol, originando a fração butanólica e a fase aquosa final.

As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador, temperatura não superior a 50 °C, retirando-se o solvente.

Esta etapa é ilustrada no fluxograma abaixo (Figura 1).

Figura 2. Fluxograma do processo de obtenção das frações hexânicas, hidroalcoólicas, fração acetatoetilênica e fração butanólica.



Fonte: compilação do autor, 2026.

4.4 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a análise de detecção das principais classes de metabólitos secundários em cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas seis cromatoplasas de sílica gel (GF-254), seguindo metodologia proposta por Rodrigues e colaboradores em 2009.

Do total de seis placas, três delas foram eluídas com mistura de solvente polar ácido (acetato de etila: ácido fórmico: água, na proporção 88:6:6). A quarta placa foi eluída com mistura de solvente polar básico (tolueno: acetato de etila: dietilamina, na proporção 70:20:10), a quinta placa, com eluente apolar (tolueno: acetato de etila, na proporção 93:7) e a sexta placa foi eluída com mistura de solvente polar ácido (clorofórmio: metanol: ácido acético: água 7:3:0,5: 0,5). Após eluição, as placas foram secas e observadas sob luz ultravioleta (UV), sendo registrados os resultados.

Para evidenciação das principais classes de substâncias químicas presentes no extrato etanólico bruto de *X. aromatica*, foram utilizados os seguintes reagentes (Rodrigues, 2009):

- DRG (Reativo de Dragendorff) e ácido sulfúrico 10%, aplicados sobre a cromatoplasa eluída no sistema polar básico para a detecção de alcaloides. A presença de alcaloides é determinada pela coloração marrom;

- Cloreto de alumínio em solução metanólica a 5%, aplicado sobre uma das cromatoplasas eluídas no sistema polar ácido para a detecção de cumarinas e flavonoides sobre luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm. A reação positiva para cumarinas é determinada pela coloração azul-verde e para flavonoides, coloração amarelo-laranja;

- Hidróxido de potássio (KOH), aplicado sobre a segunda cromatoplasa eluída no sistema polar ácido para a detecção de antraquinonas e cumarinas sobre luz UV 365 nm. A reação positiva para antraquinonas é determinada pela coloração vermelho-amarela e para cumarinas, coloração azul-verde.

- Solução de anisaldeído, aplicada sobre a terceira cromatoplasa eluída no sistema polar ácido para a detecção de terpenoides e ácidos graxos. A reação positiva para terpenóides é determinada pela coloração amarelo-marrom e para ácidos graxos, coloração azul.

- Solução de anisaldeído, aplicada sobre cromatoplasa eluída no sistema apolar para a detecção de terpenóides e ácidos graxos, em que a coloração amarelo-marrom determina a presença de terpenóides e a coloração azul, ácidos graxos.

- NP/PEG (difetilboriloxietilamina/polietilenoglicol), aplicado sobre cromatoplasa eluída no sistema polar ácido para a detecção de cumarinas (azul-verde) e flavonoides (amarelo, laranja) sobre luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm.

4.5 Linhagens celulares

Para a realização dos experimentos, foram empregadas duas linhagens celulares humanas de carcinoma urotelial de bexiga de alto grau, J82 e UM-UC-3, obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil). Ambas são amplamente utilizadas como modelos *in vitro* para investigação de mecanismos moleculares associados à tumorigênese e avaliação da atividade antineoplásica de compostos bioativos.

A linhagem J82 é derivada de carcinoma urotelial de alto grau e apresenta três mutações pontuais no gene TP53, sendo duas localizadas no éxon 8 (códon 271: Glu (GAG) → Lys (AAG); códon 274: Val (GTT) → Phe (TTT)) e uma no éxon 9 (códon 320: Lys (AAG) → Asn (AAC)). Já a linhagem UM-UC-3, caracterizada como carcinoma de alto grau músculo-invasivo, possui uma mutação pontual em TP53, localizada no éxon 4 (códon 113: Phe (TTG) → Cys (TCG)) (Pandey., 2018; Rieger, 1995). Essas alterações genéticas tornam as linhagens modelos relevantes para estudos relacionados à perda da função supressora tumoral da p53 e resistência a agentes quimioterápicos.

Como controle não tumoral, foi utilizada a linhagem MRC-5, composta por fibroblastos pulmonares humanos normais, empregada para avaliar a seletividade citotóxica dos tratamentos sobre células não neoplásicas.

Todas as linhagens foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina G, 100 U/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B, visando prevenir contaminações bacterianas e fúngicas. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

A manutenção celular foi realizada mediante subcultivo periódico ao atingirem aproximadamente 70–80% de confluência, utilizando solução de tripsina-EDTA para despreendimento celular. Para os ensaios experimentais, as células foram semeadas na densidade de 1×10^5 células por poço, em placas apropriadas para cultura celular, sendo todos os experimentos conduzidos em triplicata independente, a fim de garantir reprodutibilidade e confiabilidade estatística dos dados.

4.6 Avaliação da atividade antitumoral dos extratos e suas frações

O teste de citotoxicidade XTT (Cell Proliferation Kit II from ROCHE Diagnostics, Mannheim, Germany) foi utilizado para avaliar a viabilidade celular. Seis concentrações do extrato e frações de *X. aromatica* foram definidas: 40, 60, 80, 100, 120 e 140µg/mL com base em estudos (Rosa, 2021). Para a realização do teste, $1,0 \times 10^5$ células J82 e UMUC3 foram

semeadas e tratadas com o composto por 24 e 48 horas. Células ausentes de tratamento foram utilizadas como controle negativo e células tratadas com Cisplatina em concentração de 10 μ M foram utilizadas como controle positivo na linhagem UMUC3. Após o tratamento as células foram lavadas com uma solução de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06 g de KH₂PO₄, 0,04 g de Na₂HPO₄, 0,35 g de NaHCO₃, 8 g de NaCl, 1 g de glicose e 1 L de água Milli-Q) e incubadas em estufa com o sal tetrazólio XTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) por 2 horas (Almeida et al., 2019). Os experimentos foram realizados em triplicata técnica e através da análise em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450nm realizamos os cálculos como demonstrado na fórmula a seguir:

Todos os testes foram conduzidos em triplicata. O cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média das absorbâncias}}{\text{média das absorbâncias do controle}} \times 100$$

O software GraphPad Prism 6 será utilizado nas análises estatísticas dos resultados. Adotara-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças serão consideradas significativas para $p < 0,05$.

4.7 Cálculo da IC₅₀ e Índice de Seletividade (IS)

As frações de acetato de etila e butanólica, obtidas a partir do extrato bruto de *Xylopiya aromatica*, foram avaliadas quanto à atividade citotóxica frente às linhagens tumorais de bexiga J82 e UMUC3, além da linhagem não tumoral MRC5 (fibroblastos humanos), com o objetivo de determinar a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) e o índice de seletividade (IS). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de anfotericina, e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após atingirem confluência adequada, as células foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de 1 \times 10⁵ células/mL, e incubadas por 24 horas para aderência.

As frações foram diluídas em DMSO e aplicadas nas concentrações de 100, 120 e 140 μ g/mL, baseadas em Rosa (2021) em triplicata técnica para cada linhagem e tempo experimental. As células foram expostas aos tratamentos por 24 e 48 horas. Células tratadas com meio e DMSO foram utilizadas como controle de viabilidade (100%) e as concentrações de tratamento foram definidas de modo que o teor final de DMSO, no meio de cultura com diferentes tratamentos, não excedesse 1%, a fim de garantir a confiabilidade dos experimentos. Após os respectivos tempos de incubação 24h e 48h, foi realizado o ensaio de viabilidade

celular utilizando o reagente XTT, conforme instruções do fabricante. Após adição do reagente, as placas foram incubadas por tempo determinado, e a leitura da absorbância foi realizada exclusivamente em 450 nm utilizando leitor de microplacas.

Os dados de absorbância foram convertidos em percentual de viabilidade celular em relação ao controle conforme a fórmula:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{média das absorbâncias}}{\text{média das absorbâncias do controle}} \times 100$$

Os valores foram utilizados para construção de gráficos dose-resposta, e a IC₅₀ foi calculada a partir da equação da reta obtida por regressão linear simples ($y = ax + b$), considerando o ponto de 50% de viabilidade celular ($y = 50$) para determinar o valor de x (concentração correspondente à IC₅₀).

O índice de seletividade (IS) foi calculado por meio da razão entre a IC₅₀ da linhagem não tumoral (MRC5) e a IC₅₀ da linhagem tumoral (J82 ou UMUC3), utilizando a fórmula:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ da linhagem não tumoral (MRC5)}}{IC_{50} \text{ da linhagem tumoral (J82 ou UMUC3)}}$$

4.8 Avaliação da Morfologia Celular

Para avaliar a capacidade da *Xylopiá aromática*, 1×10^5 células foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com as concentrações de 100µg/mL, 120µg/mL e 140µg/mL de *Xylopiá aromática* em experimentos de citotoxicidade. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Após o tratamento, as células foram observadas em microscópio invertido com contraste de fase, no aumento de 200x. As alterações foram fotografadas utilizando uma câmera digital com o auxílio de adaptador de câmera para microscópio.

4.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism® 8. Os experimentos foram realizados em triplicata técnica. A significância estatística foi calculada por meio da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Os dados são apresentados com a média e o desvio padrão. A significância estatística estabelecida foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Extrações

A extração realizada teve como objetivo isolar compostos presentes nas sementes/bagas de *X. aromatica*, através da moagem de 219,092 g de material inicial. A extração bruta resultou em 28,02 g de extrato, o que corresponde a um rendimento de 12,8% em relação à massa inicial de sementes/bagas. A análise do rendimento é crucial, pois fornece uma visão sobre a eficiência do método utilizado além do isolamento dos componentes desejados a partir do material vegetal.

5.1.2 Fracionamento a partir do EEB

A partir de 10,04 g de EEB (extrato etanólico bruto), foram realizadas novas extrações para obter frações em solventes específicos, com o intuito de purificar os compostos isolados e facilitar a posterior análise.

- Fração hexânica: Foram obtidos 3,37 g dessa fração, representando um rendimento de 33,5% em relação à massa de EEB utilizada. Esta fração é normalmente rica em compostos apolares, como lipídios ou hidrocarbonetos.

- Fração de acetato de etila: O fracionamento resultou em 0,27 g desta fração, com um rendimento de 2,6%. A fração de acetato de etila geralmente contém compostos de polaridade intermediária, como flavonoides ou ésteres.

- Fração butanólica: O fracionamento resultou em 0,212 g desta fração, com um rendimento de 2,11%. A fração butanólica geralmente contém compostos de alta polaridade, como flavonoides glicosilados, saponinas e outros metabólitos fenólicos mais polares.

5.2 Cromatografia em Camada Delgada

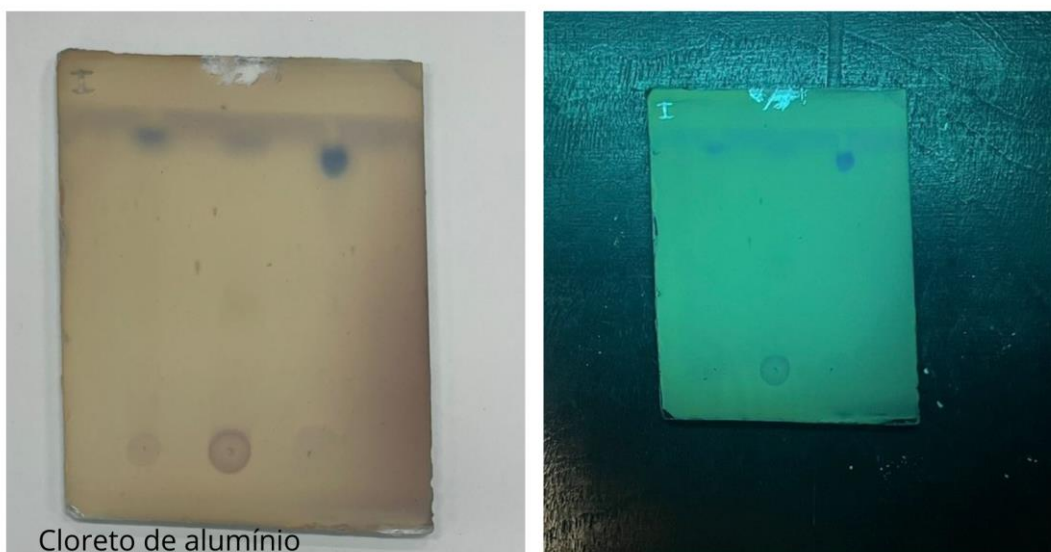


Figura 3 - Cromatoplaça eluída em sistema polar ácido, revelada com cloreto de alumínio em solução metanólica a 5% e analisada sob luz ultravioleta ($\lambda = 365 \text{ nm}$), para a detecção de cumarinas e flavonoides. A reação positiva foi caracterizada por coloração azul-esverdeada para cumarinas

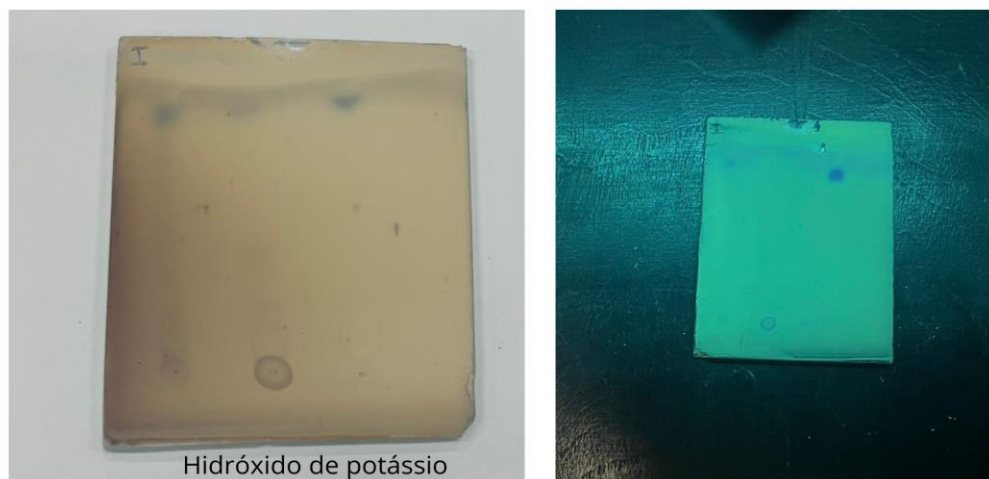


Figura 4 - Cromatoplaça eluída em sistema polar ácido, revelada com hidróxido de potássio (KOH) e analisada sob luz ultravioleta ($\lambda = 365 \text{ nm}$), para a detecção de antraquinonas e cumarinas. A presença de antraquinonas não foi detectada, enquanto cumarinas apresentaram coloração azul-esverdeada.

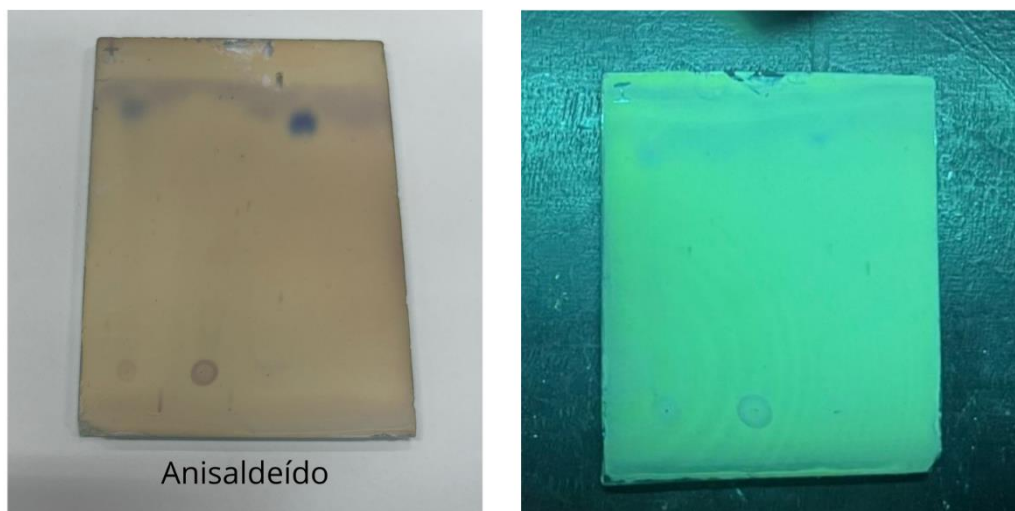


Figura 5 - Cromatoplaça eluída em sistema polar ácido, revelada com solução de anisaldeído, utilizada para a detecção de terpenoides e ácidos graxos. A reação positiva para terpenoides foi evidenciada por coloração amarelo-marrom e, para ácidos graxos, por coloração azul.

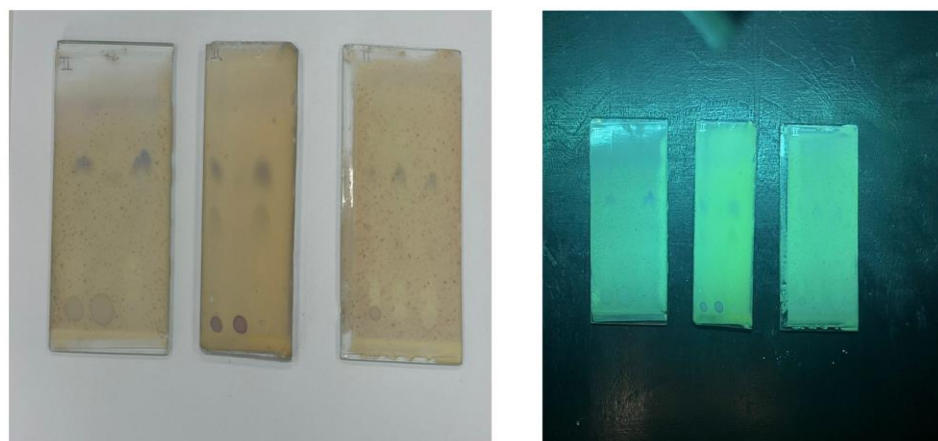


Figura 6 - Cromatoplaça eluída em sistema polar básico, revelada com Reativo de Dragendorff (DRG) e ácido sulfúrico a 10%, utilizada para a detecção de alcaloides. A presença de alcaloides não foi detectada.

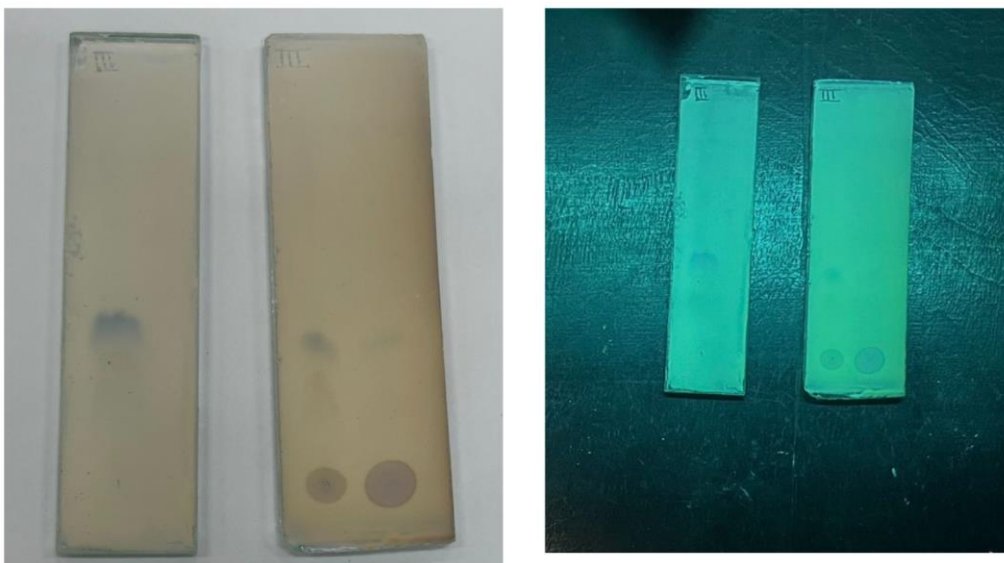


Figura 7 - Cromatoplaca eluída em sistema apolar, revelada com solução de anisaldeído, para a detecção de terpenoides e ácidos graxos. A presença de ácidos graxos foi indicada por coloração por coloração azul.

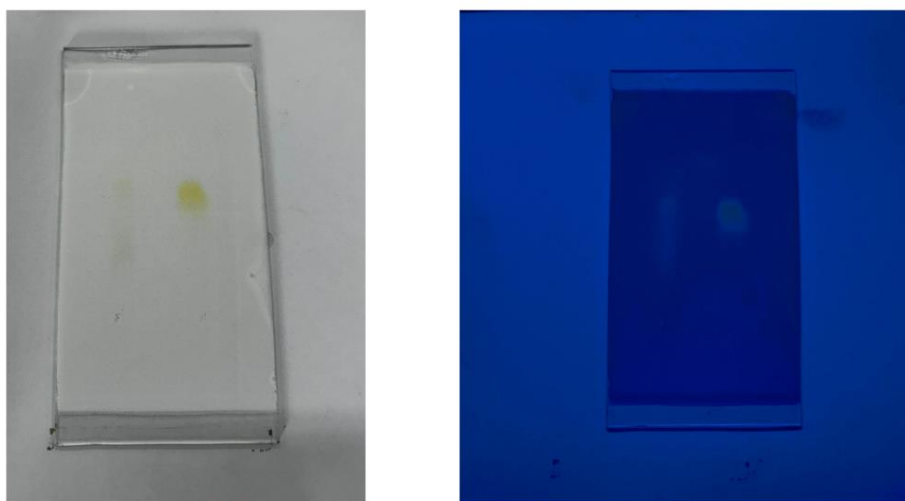


Figura 8- Cromatoplaca eluída em sistema polar ácido, revelada com NP/PEG (difênilboriloxietilamina/polietilenoglicol) e analisada sob luz ultravioleta ($\lambda = 365 \text{ nm}$), para a detecção de cumarinas e flavonoides. A reação positiva foi observada pela coloração amarelo a alaranjada para flavonoides.

De acordo com os testes realizados, chegou-se aos resultados representados na tabela abaixo:

Tabela 1: Teste de cromatografia em camada delgada apresentando os principais metabólitos secundários presentes nas sementes/bagas de *Xylopia aromatica*.

Sistema Eluente	Revelador	Classe	Coloração Indicativa	Detectado
Polar básico	Dragendorff	Alcaloides	Marrom	-
Polar ácido	AlCl ₃	Flavonoides	Amarelo-laranja	-
Polar ácido	AlCl ₃	Cumarinas	Azul-verde	+
Polar ácido	KOH	Antraquinonas	Vermelho-amarela	-
Polar ácido	KOH	Cumarinas	Azul-verde	+
Apolar	Anisaldeído	Terpenoides	Amarelo-marrom	+
Apolar	Anisaldeído	Ácidos graxos	Azul	+
Polar ácido	NP/PEG	Flavonoides	Amarelo / Laranja	+
Polar ácido	NP/PEG	Cumarinas	Azul-verde	-

Tabela 1: Detecção de classes de metabólitos secundários por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando diferentes sistemas eluentes e reagentes reveladores. As colorações observadas após revelação indicam a possível presença das seguintes classes químicas: marrom para alcaloides (reagente de Dragendorff); amarelo-laranja ou amarelo/laranja para flavonoides (AlCl₃ ou NP/PEG); azul-verde para cumarinas (AlCl₃ ou KOH); vermelho-amarela para antraquinonas (KOH); amarelo-marrom para terpenoides (anisaldeído); e azul para ácidos graxos (anisaldeído). O símbolo (+) indica presença e (-) ausência dos metabólitos nas condições analisadas.

5.3 Teste de Citotoxicidade

As linhagens celulares de carcinoma de bexiga J82 e UMUC3 foram tratadas com o extrato bruto e as frações hexânica, acetato de etila e butanólica, nas concentrações de 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µg/mL. A cisplatina (10 µM), utilizada como controle positivo, apresentou redução acentuada da viabilidade. A avaliação da linhagem J82 (Figuras 9, 10, 11 e 12) demonstrou que, após 24 horas de tratamento, as concentrações de 100 µg/mL, 120 µg/mL e

140µg/mL reduziram a viabilidade celular em relação ao grupo controle de 51 a 75%. Logo, as concentrações 100 µg/mL, 120 µg/mL e 140µg/mL e foram indicadas para a realização dos testes subsequentes. A avaliação da linhagem celular UMUC3 (Figuras 13, 14, 15 e 16) após 24 horas de tratamento, demonstrou que os grupos tratados com as concentrações de 80 µg/mL, 100 µg/mL, 120 µg/mL e 140µg/mL apresentaram redução da viabilidade celular em relação ao grupo controle de 49-65% para o extrato bruto e a fração hexânica. Já a fração de acetato de etila apresentou maior redução na viabilidade celular em todas as concentrações testadas, chegando próximo da redução apresentada pela Cisplatina em relação ao grupo controle de 45%.

A variabilidade de resposta observada nos ensaios de citotoxicidade entre as linhagens J82 e UMUC3 pode estar relacionada às diferenças intrínsecas no perfil molecular e no comportamento biológico dessas células. Ambas derivam de carcinoma urotelial de bexiga, porém apresentam características genéticas e fenotípicas distintas, que influenciam diretamente sua sensibilidade a agentes citotóxicos.

A linhagem J82 é frequentemente descrita como mais agressiva, apresentando elevada taxa proliferativa e alterações moleculares associadas à progressão tumoral, incluindo mutações em genes reguladores do ciclo celular e da apoptose. Essas características podem conferir maior resistência a compostos que atuam predominantemente por indução de dano celular ou bloqueio proliferativo, exigindo concentrações mais elevadas para redução significativa da viabilidade.

Por outro lado, a UMUC3 também representa um fenótipo de alto grau, porém com perfil molecular distinto, incluindo diferenças na expressão de proteínas envolvidas em vias de sobrevivência celular, como sinalização PI3K/AKT e regulação de p53. Dependendo do mecanismo de ação do extrato ou frações avaliadas, essas particularidades podem tornar a linhagem mais suscetível à indução de apoptose ou à modulação do ciclo celular, o que explicaria a maior redução de viabilidade observada em determinadas concentrações.

Assim, a divergência nos perfis de citotoxicidade reforça a importância da utilização de múltiplas linhagens celulares em estudos antitumorais, uma vez que a resposta terapêutica é fortemente influenciada pelo contexto molecular específico de cada modelo tumoral.

Com base nesses resultados iniciais, a fração de acetato de etila e, posteriormente, a fração butanólica, após etapa adicional de extração e testes preliminares, foram selecionadas para a continuidade dos ensaios por apresentarem os melhores resultados em termos de atividade biológica. As Figuras 17 e 18 mostram as curvas dose-resposta dessas frações nas na linhagem não tumoral MRC5. A avaliação paralela da linhagem não tumoral MRC5 foi realizada com o objetivo de comparar a citotoxicidade das frações em células normais e

tumorais, permitindo o cálculo do índice de seletividade (IS). Os resultados demonstraram que ambas as frações também reduziram a viabilidade das células MRC5 de maneira semelhante à observada nas linhagens tumorais, especialmente após 48 horas de exposição nas concentrações de 100 µg/mL, 120 µg/mL e 140 µg/mL. Conseqüentemente, os valores de índice de seletividade obtidos foram baixos, indicando ausência de seletividade significativa das frações pelos modelos tumorais avaliados. Esses achados sugerem que, embora as frações apresentem atividade citotóxica relevante, seu efeito não é específico para células neoplásicas, o que pode limitar sua aplicação terapêutica direta sem etapas adicionais de fracionamento ou isolamento dos compostos bioativos responsáveis pela atividade observada. Todos os testes foram realizados em triplicata, correspondendo a replicatas técnicas obtidas a partir da mesma preparação experimental.

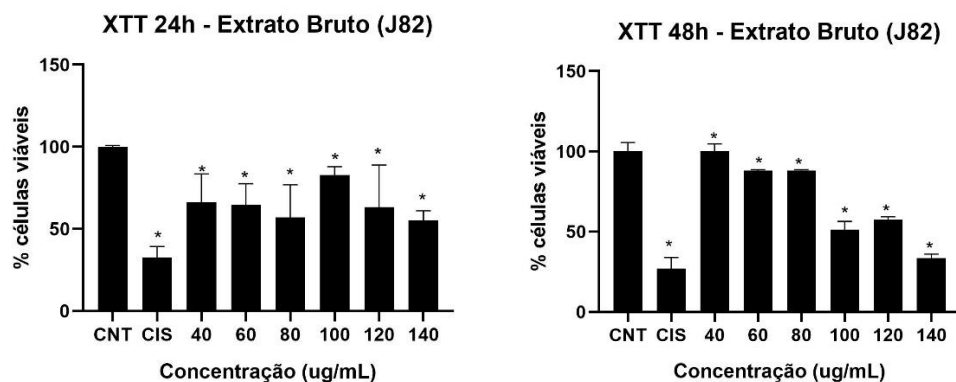


Figura 9: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular J82 derivada do carcinoma de bexiga após 24 e 48 horas de tratamento com extrato bruto, derivado da *X.aromatica*, respectivamente, * $p > 0,05$ comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina-10µM.

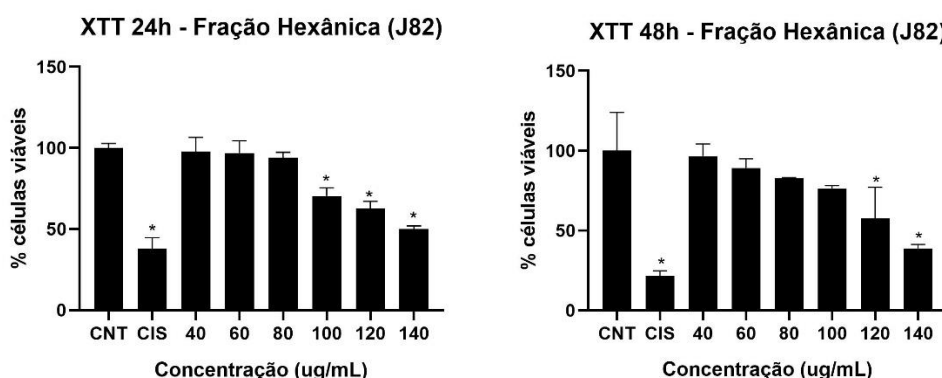


Figura 10: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular J82 derivada do carcinoma de bexiga após 24 e 48 horas de tratamento com a fração hexânica derivado da *X. aromatica*, respectivamente, * $p > 0,05$ comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina-10µM.

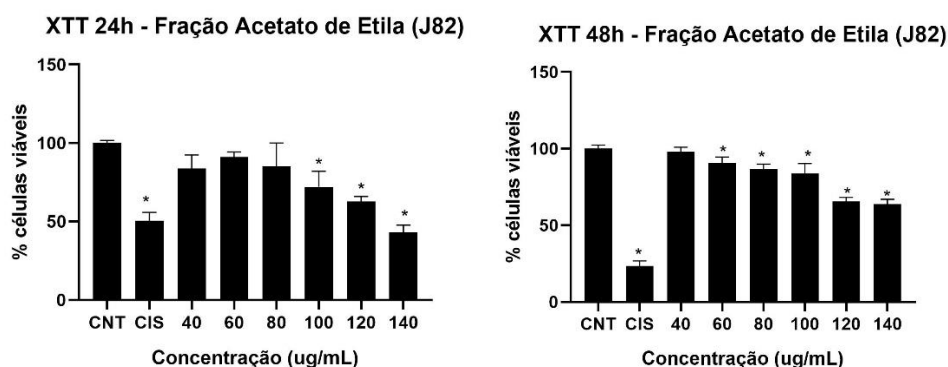


Figura 11: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular J82 derivada do carcinoma de bexiga após 24 e 48 horas de tratamento com a fração de acetato de etila derivado da *X.aromatica*, respectivamente, * $p > 0,05$ comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina- 10 μ M.

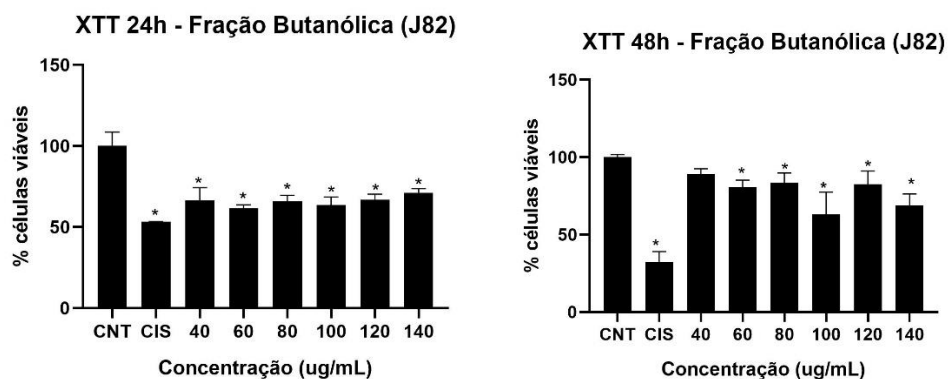


Figura 12: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular J82 derivada do carcinoma de bexiga após 24 e 48 horas de tratamento com a fração butanólica derivado da *X.aromatica*, respectivamente, * $p > 0,05$ comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina- 10 μ M.

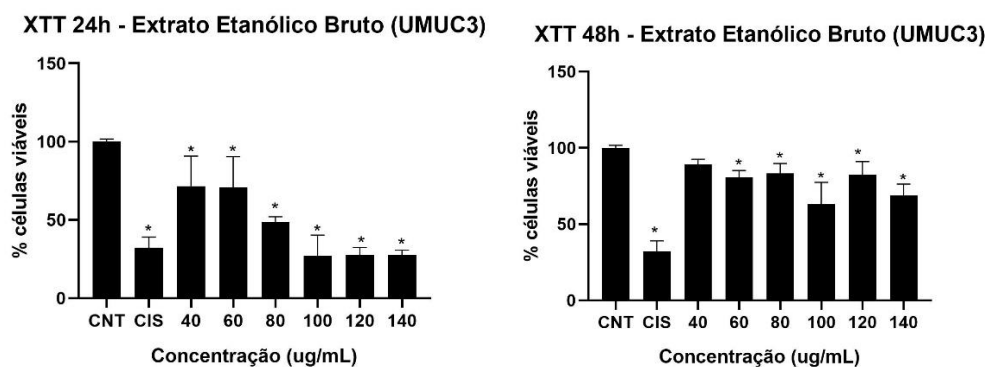


Figura 13: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular UMUC3 derivada do carcinoma de bexiga após 24 e 48 horas de tratamento com extrato bruto derivado da *X.aromatica*, respectivamente, * $p > 0,05$ comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina- 10 μ M.

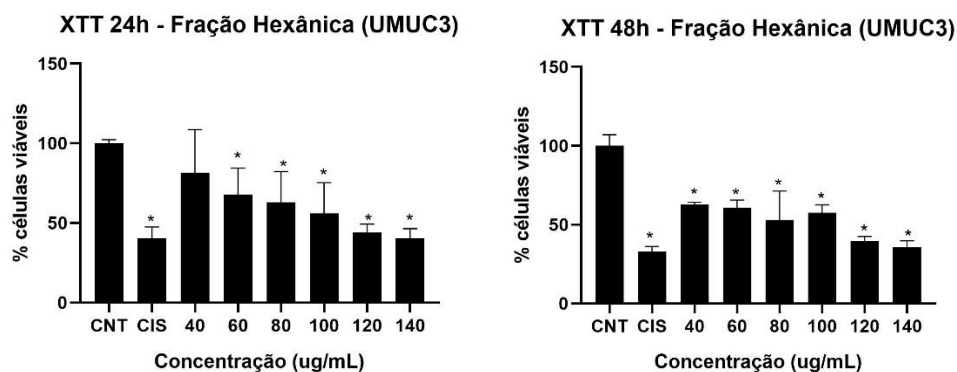


Figura 14: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular UMUC3 derivada do carcinoma de bexiga após 24 e 48 horas de tratamento com a fração hexânica derivado da *X.aromatica*, respectivamente, * $p > 0,05$ comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina- 10 μ M.

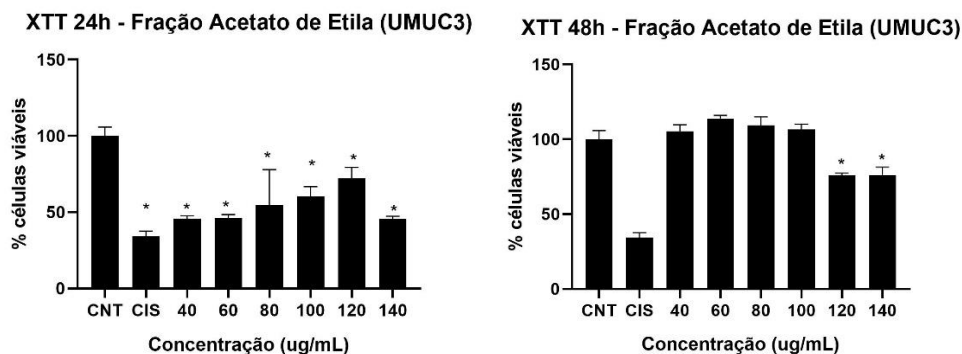


Figura 15: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular UMUC3 derivada do carcinoma de bexiga após 24 e 48 horas de tratamento com a fração acetato de etila derivado da *X.aromatica*, respectivamente, * $p > 0,05$ comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina- 10 μ M.

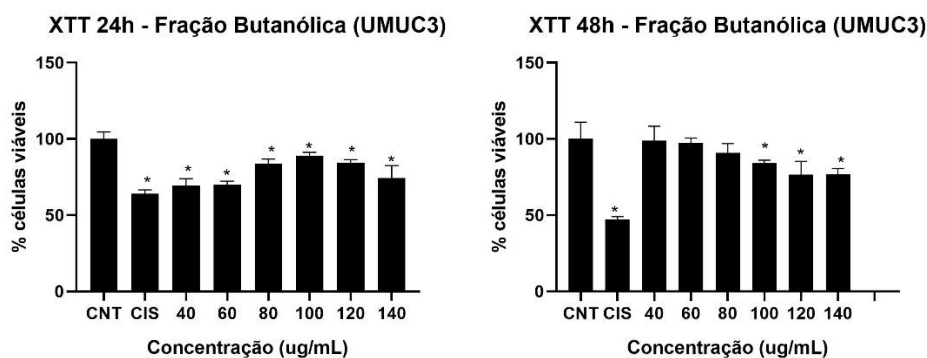


Figura 16: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular UMUC3 derivada do carcinoma de bexiga após 24 e 48 horas de tratamento com a fração butanólica derivado da *X.aromatica*, respectivamente, * $p > 0,05$ comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina- 10 μ M.

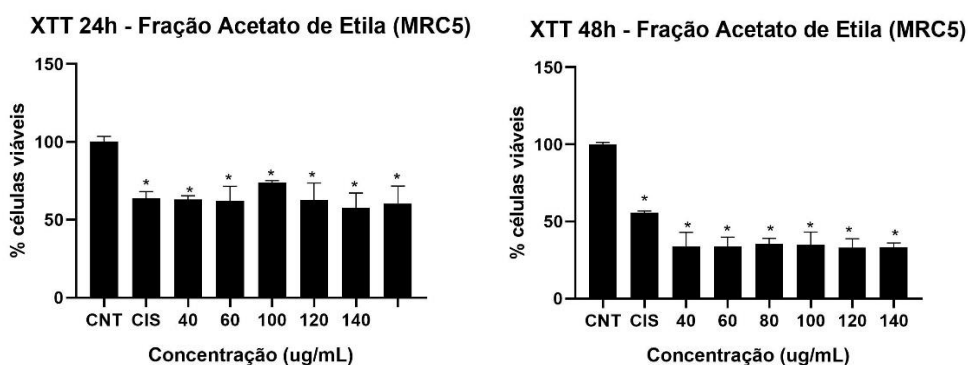


Figura 17: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular não tumoral MRC5 após 24 e 48 horas de tratamento com a fração acetato de etila derivado da *X.aromatica*, respectivamente, * p > 0,05 comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina- 10µM.

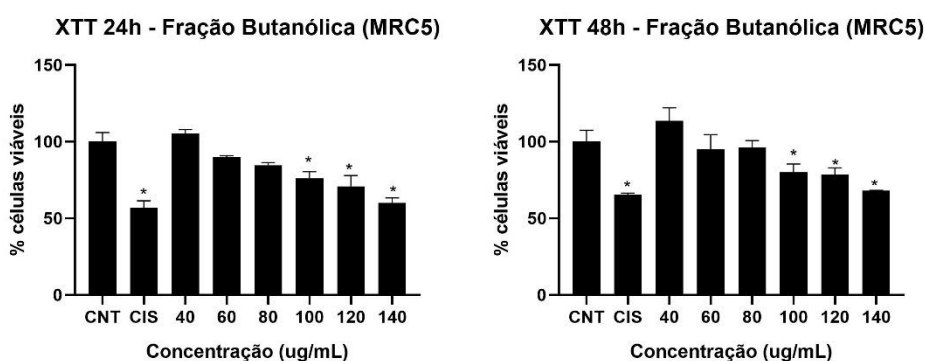


Figura 18: Ensaio de citotoxicidade referente a linhagem celular não tumoral MRC5 após 24 e 48 horas de tratamento com a fração butanólica derivado da *X.aromatica*, respectivamente, * p > 0,05 comparado com o CNT. CNT: controle não tratado. CIS: Cisplatina- 10µM.

5.4 Cálculo da IC₅₀ e Índice de Seletividade (IS)

5.4.1 - Linhagem UMUC3

Tabela 2 – Valores de Concentração Inibitória Média de 50% (IC₅₀) e Índice de Seletividade (IS) das frações acetato de etila e butanólica de *Xylopia aromatica* na linhagem tumoral UMUC3 após 24 e 48 horas de exposição.

Fração	Tempo	IC ₅₀ (µg/mL,)	IC ₅₀ MRC5 (referência)	IS (MRC5 / UMUC3)
Acetato de Etila	24 horas	131,90	157,82	1,19
Acetato de Etila	48 horas	318,40	59,34	0,18
Butanólica	24 horas	554,38	185,30	0,33
Butanólica	48 horas	274,11	222,62	0,81

5.4.2 - Linhagem J82

Tabela 3 – Valores de Concentração Inibitória Média de 50% e Índice de Seletividade das frações acetato de etila e butanólica de *Xylopiya aromatica* na linhagem tumoral J82 após 24 e 48 horas de exposição.

Fração	Tempo	IC50 (µg/mL,)	IC50 MRC5 (referência)	IS (MRC5 /J82)
Acetato de Etila	24 horas	151,09	157,82	1,04
Acetato de Etila	48 horas	198,58	59,34	0,29
Butanólica	24 horas	204,29	185,30	0,90
Butanólica	48 horas	228,78	222,62	0,97

5.5 Avaliação da morfologia celular

Foi realizado uma análise qualitativa da morfologia celular após o tratamento com diferentes concentrações de *X.aromatica*, observando redução da densidade celular de maneira dose-dependente nas linhagens celulares UMUC3 (Figura 13) e J82 (Figura 14). Além disso, observa-se que o tratamento levou a alterações na morfologia celular, com o aparecimento de extensões celulares longas, aparência irregular na forma das células, células arredondadas, células mortas e debris celulares.

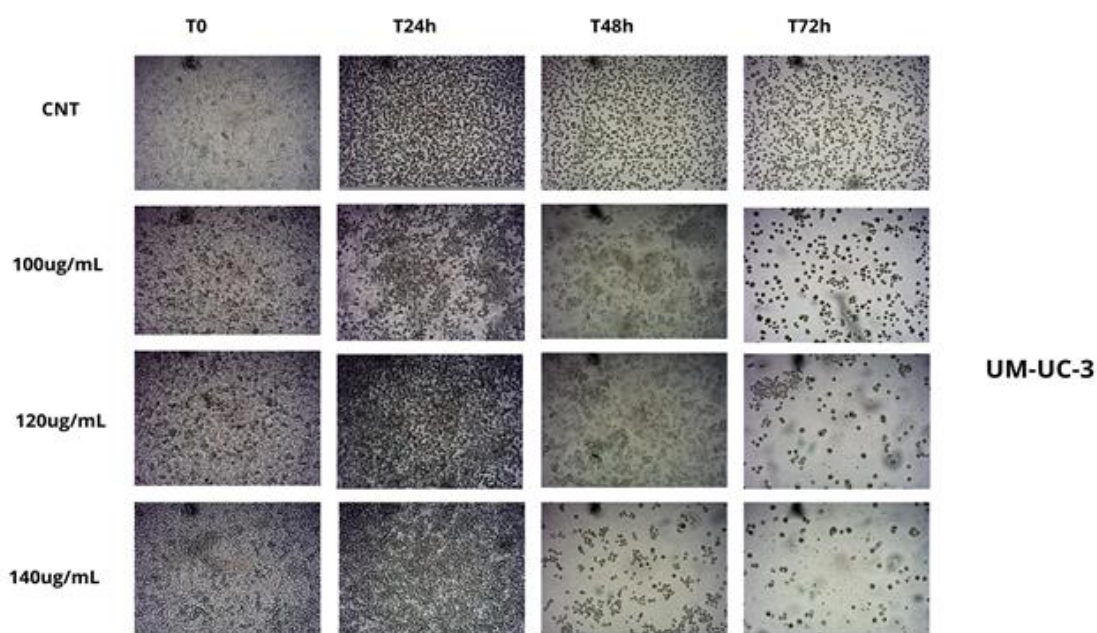


Figura 19 – Alterações morfológicas observadas na linhagem UMUC3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a fração butanólica.

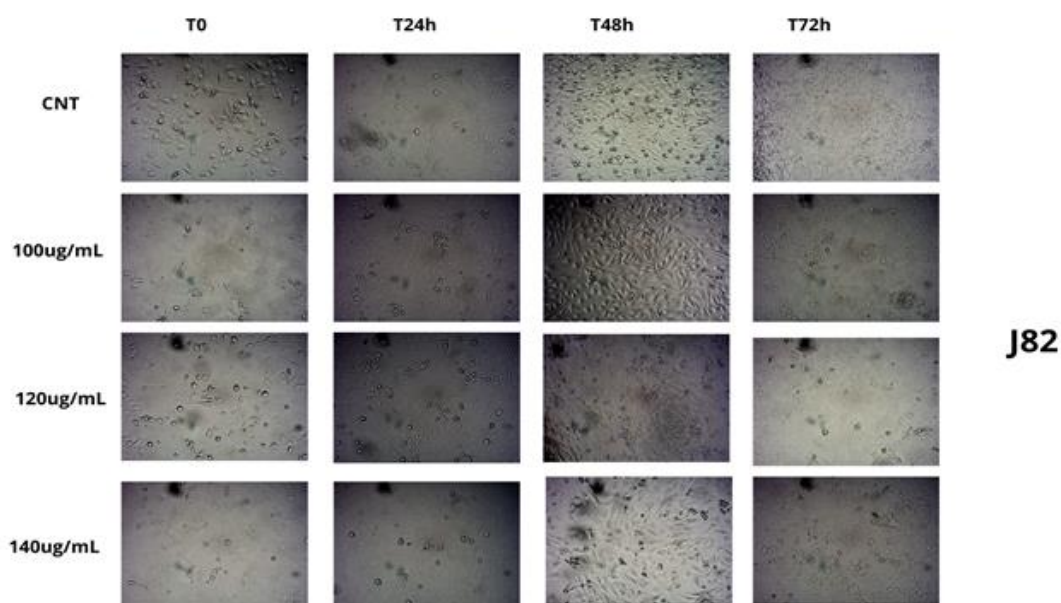


Figura 20 – Alterações morfológicas observadas na linhagem J82 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a fração butanólica.

6 DISCUSSÃO

Extratos são manipulações concentradas que podem estar na forma líquida, viscosa ou em pó e que são feitos a partir das partes secas da planta através de alguns métodos já predefinidos na literatura científica (Schulz, 2002). A extração ocorre através de processo físico-químico de transferência de massa, em que os sólidos solúveis e voláteis são extraídos por meio do contato entre o solvente e os sólidos (Clarke, 1985). Os resultados da extração de *Xylopia aromatica* podem ser discutidos com base no estudo realizado por Karoline P. C. et al. (2021). A extração por percolação gerou um rendimento de 12,8% de extrato bruto a partir das sementes/bagas, com obtenção de fração hexânica, fração de acetato de etila e fração butanólica, apresentando rendimentos de 33,5%, 2,6% e 2,11%, respectivamente.

Ao analisar a porcentagem dos rendimentos, embora uma fração da massa inicial tenha sido convertida em extrato, ainda há uma quantidade considerável de material que não foi extraído. Isso pode ter ocorrido devido a diversos fatores, como a natureza química dos compostos desejados, a técnica de extração utilizada e as condições de temperatura e tempo, uma vez que as condições em que o processo de extração é realizado e a qualidade da matéria-prima vegetal influenciam o rendimento da extração (Wongkittipong, 2004; Schulz, 2002).

A análise fitoquímica preliminar por cromatografia em camada delgada (CCD) revelou a presença de cumarinas, flavonoides, terpenoides e ácidos graxos, demonstrando a ampla

diversidade metabólica da espécie. Estudos fitoquímicos prévios com espécies do mesmo gênero também demonstraram a ocorrência de flavonoides, terpenoides e outros metabólitos fenólicos, reforçando que a espécie analisada apresenta perfil químico compatível com o já descrito na literatura (Oliveira, 2012). Sob a perspectiva da farmacognosia, a identificação dessas classes apresenta informações relevantes tanto para a caracterização química da espécie quanto para o entendimento de seu possível valor terapêutico.

As cumarinas constituem uma classe de compostos naturais caracterizados pelo núcleo benzopirônico (2H-cromen-2-ona), amplamente distribuídos em plantas e estudados por sua relevância na química medicinal. Essa estrutura básica permite interações com diferentes enzimas e receptores biológicos, o que justifica o crescente interesse científico no desenvolvimento de derivados com variados perfis farmacológicos, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiumoral (Franco, 2021).

Já os flavonoides são caracterizados por possuírem 15 carbonos (C6–C3–C6) em sua estrutura, organizados em dois anéis aromáticos (A e B) conectados por um heterociclo de três carbonos (anel C), permitindo elevada capacidade de doação de elétrons e estabilização de radicais livres. O número e a posição dos grupos hidroxila influenciam diretamente sua polaridade e atividade biológica (Simões, 2017).

Os terpenoides derivam de unidades de isopreno (C₅H₈) e apresentam elevada variabilidade estrutural e lipofilicidade, podendo ser classificados em mono-, sesqui-, di- e triterpenos conforme o número de unidades isoprênicas. Essa característica estrutural favorece sua interação com membranas biológicas e proteínas transmembrana (Dewick, 2009).

Por fim, os ácidos graxos são compostos formados por cadeias de hidrocarbonetos de comprimento variável associadas a um grupo carboxílico terminal. Dependendo do grau de saturação (saturados ou insaturados), apresentam diferenças estruturais que influenciam sua fluidez e reatividade química. Em sistemas biológicos, desempenham papel fundamental na composição da bicamada lipídica das membranas celulares e podem atuar como moduladores de vias metabólicas e inflamatórias, especialmente quando presentes em frações lipofílicas de extratos vegetais (Dewick, 2009).

Após a análise isolada de cada fração, foi observado que a fração hexânica concentrou predominantemente terpenoides e ácidos graxos, em virtude de sua baixa polaridade. Terpenoides são compostos estruturalmente baseados em cadeias isoprenoides que conferem caráter hidrofóbico e alta afinidade por ambientes lipídicos (Dewick, 2009). Essa característica estrutural favorece sua inserção em membranas biológicas, podendo alterar fluidez e permeabilidade celular. Os ácidos graxos, constituídos por cadeias hidrocarbonadas com grupo

carboxílico terminal, também apresentam comportamento lipofílico quando não esterificados. Do ponto de vista farmacológico, essas classes podem atuar na modulação de processos inflamatórios, na integridade de membranas mitocondriais e na regulação de vias associadas ao metabolismo lipídico, influenciando a homeostase celular.

A fração acetato etilênica, de polaridade intermediária, apresentou presença de cumarinas e flavonoides menos polares, possivelmente em suas formas agliconas. A estrutura benzopirônica das cumarinas permite interações com enzimas oxidativas e proteínas reguladoras do ciclo celular, enquanto flavonoides agliconas, por não apresentarem açúcares ligados, exibem maior lipofilicidade e, conseqüentemente, maior capacidade de atravessar membranas celulares (Franco, 2021; Simões, 2017). Essa característica estrutural pode justificar a maior atividade observada para essa fração nos ensaios biológicos, uma vez que compostos de polaridade intermediária tendem a apresentar melhor permeabilidade celular.

No contexto da atividade antitumoral, as cumarinas têm sido descritas na literatura como compostos capazes de atuar por múltiplos mecanismos moleculares. Entre os mecanismos propostos, destaca-se a indução de apoptose por meio da via mitocondrial intrínseca, caracterizada pelo aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e subsequente ativação de caspases envolvidas na execução da morte celular programada. Estudos também sugerem que esse processo pode ocorrer de maneira independente do status funcional da proteína p53, aspecto particularmente relevante em tumores que frequentemente apresentam mutações nesse gene supressor, como os carcinomas uroteliais (Franco, 2021). No presente estudo, embora não tenham sido avaliados diretamente os eventos moleculares associados à apoptose, a atividade citotóxica observada para as frações ricas em cumarinas é consistente com os efeitos biológicos previamente relatados para essa classe de metabólitos. Além disso, derivados cumarínicos podem promover bloqueio ou modulação do ciclo celular, resultando no acúmulo de células em fases como G0/G1 ou G2/M, contribuindo para a redução da proliferação celular. A interferência em quinases regulatórias e proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular reforça o potencial dessas moléculas como moduladores de crescimento tumoral.

A fração butanólica, mais polar, evidenciou principalmente flavonoides polares, possivelmente glicosilados. A glicosilação ocorre pela ligação de açúcares à estrutura flavonoídica, aumentando a polaridade e a solubilidade em solventes como o n-butanol. Estruturalmente, essa modificação influencia propriedades como estabilidade e comportamento farmacocinético *in vitro*, podendo afetar a forma como a molécula interage com sistemas celulares.

Flavonoides são reconhecidos por sua capacidade de interferir no estado redox celular, atuando tanto como sequestradores de espécies reativas de oxigênio quanto como moduladores de sistemas antioxidantes endógenos. Em células neoplásicas, alterações no balanço oxidativo estão intimamente relacionadas à sustentação da proliferação e à evasão de mecanismos de morte celular. Nesse contexto, há evidências de que compostos dessa classe possam impactar rotas de sinalização intracelular sensíveis ao status redox, incluindo as vias PI3K/Akt e MAPK, conhecidas por participarem da regulação do crescimento, da sobrevivência e da apoptose (Amado, 2011). Embora tais eventos moleculares não tenham sido diretamente investigados neste trabalho, a redução da viabilidade celular observada nas amostras analisadas é coerente com os efeitos antitumorais já descritos para flavonoides em diferentes modelos experimentais.

Nas linhagens UMUC3 e J82, caracterizadas por alterações em vias de controle proliferativo, a interferência nessas rotas pode contribuir para a diminuição da viabilidade celular observada nos ensaios. Além disso, flavonoides podem influenciar a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular e da apoptose, reforçando o potencial da fração butanólica em promover efeitos antiproliferativos.

Assim, a distribuição dos metabólitos entre as frações está diretamente relacionada às suas características estruturais e propriedades físico-químicas, evidenciando coerência entre a estratégia de fracionamento empregada e o perfil químico obtido. As frações que apresentaram maior atividade biológica, acetato de etila e butanólica, foram justamente aquelas enriquecidas em compostos fenólicos, reconhecidos por sua capacidade de modular processos oxidativos, vias de sinalização intracelular e mecanismos de morte celular programada.

Dessa forma, além de sustentar a caracterização farmacognóstica da espécie, os resultados permitem estabelecer uma base química consistente para os efeitos citotóxicos observados nas linhagens UMUC3 e J82, direcionando futuras etapas de isolamento e identificação dos compostos responsáveis pela atividade antitumoral.

A avaliação inicial da atividade antitumoral foi realizada por meio do ensaio de viabilidade celular (XTT), no qual todas as frações obtidas a partir do extrato bruto de *Xylopiá aromática* foram testadas frente às linhagens tumorais de bexiga UMUC3 e J82, nas concentrações de 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µg/mL. De maneira geral, observou-se que as frações apresentaram perfis distintos de atividade citotóxica, com redução da viabilidade celular dependente da concentração e da linhagem avaliada. A fração hexânica demonstrou efeito citotóxico moderado e pouco consistente, com reduções moderadas da viabilidade, enquanto o extrato bruto apresentou atividade intermediária. Em contrapartida, as frações de acetato de etila e butanólica destacaram-se por promoverem reduções mais expressivas na viabilidade

celular, principalmente nas maiores concentrações testadas, indicando maior potencial biológico dessas amostras.

A busca por agentes antitumorais com maior especificidade e menores efeitos colaterais têm impulsionado a investigação de novas moléculas provenientes de produtos naturais como alternativas para o tratamento de cânceres (Sheng, 2011). Nesse contexto, após análise comparativa dos resultados de viabilidade celular, optou-se por prosseguir com os ensaios subsequentes utilizando apenas as frações de acetato de etila e butanólica, por terem apresentado os efeitos citotóxicos mais relevantes e consistentes entre todas as amostras avaliadas. Além disso, foram selecionadas as três melhores concentrações testadas (100, 120 e 140 µg/mL), por representarem a faixa em que se observou maior resposta biológica, permitindo uma avaliação mais aprofundada do potencial antitumoral dessas frações.

A análise da citotoxicidade das frações de *Xylopia aromatica* revelou uma variação expressiva na potência biológica, com destaque para a fração de acetato de etila, que apresentou os menores valores de IC₅₀ de 131,9 µg/mL na linhagem UMUC3 e 151,09 µg/mL 151,09 µg/mL na linhagem J82. No entanto, sob uma perspectiva crítica e comparativa com os critérios estabelecidos pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos EUA, que considera extratos e frações como promissores apenas quando apresentam IC₅₀ < 30 µg/mL, os valores obtidos situam-se em uma faixa de baixa a moderada potência citotóxica. A literatura indica que o gênero *Xylopia* é uma fonte rica em alcaloides isoquinolínicos e acetogeninas, compostos frequentemente associados a atividades antitumorais potentes em concentrações significativamente menores. O fato de os valores observados neste estudo serem superiores a 100 µg/mL sugere que os princípios ativos presentes nas sementes podem estar em concentrações reduzidas dentro das frações testadas, ou que a sensibilidade das linhagens de carcinoma urotelial (UMUC3 e J82) a esses metabólitos específicos é limitada. Ademais, a discrepância de potência entre a fração de acetato de etila e a fração butanólica (IC₅₀ de 554,38 µg/mL na linhagem UMUC3) reforça que os compostos com potencial biológico nestas sementes possuem polaridade intermediária, uma vez que solventes mais polares, como o n-butanol, tendem a arrastar açúcares e outros constituintes primários que podem diluir a atividade citotóxica.

Entretanto, diferentemente do perfil esperado para candidatos com potencial terapêutico, as frações de acetato de etila e butanólica não demonstraram seletividade para células tumorais, uma vez que ambas promoveram redução da viabilidade também na linhagem não tumoral MRC5 em todas as concentrações testadas. O índice de seletividade (IS), calculado

a partir da razão entre a concentração citotóxica em células não tumorais e em células tumorais ($IS = CC_{50} \text{ não tumoral} / CC_{50} \text{ tumoral}$), permaneceu inferior a 1 na maioria das condições experimentais, indicando ausência de preferência citotóxica por células neoplásicas e, em alguns casos, maior sensibilidade das células normais. De acordo com o NCI e diversos estudos de triagem farmacológica, valores de IS superiores a 2 ou 3 são geralmente considerados indicativos de seletividade biológica relevante, enquanto valores próximos ou inferiores a 1, como os observados neste trabalho, refletem um perfil citotóxico pouco discriminatório.

A baixa seletividade observada tem implicações farmacológicas diretas, uma vez que a eficácia terapêutica de agentes antineoplásicos está intrinsecamente relacionada à sua capacidade de atingir preferencialmente células tumorais, preservando, na maior medida possível, tecidos saudáveis. Compostos com citotoxicidade não seletiva tendem a apresentar uma janela terapêutica reduzida, na qual as concentrações necessárias para inibir o crescimento tumoral se aproximam ou se sobrepõem às concentrações que causam dano a células normais, aumentando o risco de efeitos adversos sistêmicos. Em um cenário clínico, esse perfil poderia se traduzir em toxicidade hematológica, gastrointestinal ou tecidual, limitando a dose máxima tolerada e, conseqüentemente, a eficácia do tratamento. Além disso, a ausência de seletividade compromete a relação risco–benefício do composto, um dos principais critérios considerados em etapas de desenvolvimento pré-clínico e clínico. Fármacos antitumorais que não apresentam diferença significativa de sensibilidade entre células normais e tumorais tendem a ser descontinuados ou requerem estratégias adicionais, como modificação estrutural, sistemas de liberação direcionada ou uso em terapias combinadas, para alcançar um perfil terapêutico aceitável.

Apesar dessa limitação, a atividade citotóxica observada indica que as frações de acetato de etila e butanólica contêm metabólitos com potencial biológico relevante, o que justifica a continuidade dos estudos com abordagens voltadas ao isolamento de compostos individuais e à avaliação de sua seletividade. A identificação de moléculas com maior especificidade para células tumorais poderá permitir a exploração desses metabólitos como protótipos para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos com melhor perfil farmacológico.

As alterações morfológicas celulares, avaliadas após 24, 48 e 72 horas de exposição, revelaram características associadas a comprometimento da integridade celular, como retração, perda de aderência, irregularidade no formato e redução do volume celular, especialmente nas

concentrações mais elevadas (120 e 140 µg/mL). Essas modificações foram observadas em ambas as linhagens tumorais, indicando que as frações testadas exerceram efeito biológico mensurável mesmo sem evidência de seletividade. Em conjunto com a redução da atividade metabólica detectada pelo ensaio de XTT, tais achados sugerem diminuição da viabilidade celular ao longo do tempo de tratamento. Embora alterações morfológicas semelhantes já tenham sido descritas em processos de morte celular programada, os métodos empregados neste estudo não permitem confirmar o tipo de morte celular envolvido nem a ativação de vias moleculares específicas (Elmore, 2007; Green, 2015).

Em conjunto, os resultados mostram que as frações de *Xylopi*a *aromatica*, especialmente as frações de acetato de etila e butanólica, apresentam atividade antitumoral significativa *in vitro* frente às linhagens UMUC3 e J82, atuando na viabilidade celular e na indução de alterações morfológicas compatíveis com morte celular. No entanto, a ausência de seletividade frente à linhagem não tumoral ($IS < 1$) limita sua aplicação direta como fitoterápico ou quimioterápico. Em suma, os dados reforçam o potencial dessas frações como fonte de moléculas bioativas, que após purificação, fracionamento ou modificação estrutural, poderão apresentar melhor perfil de seletividade e segurança. Estudos adicionais de isolamento, caracterização e testes mecanísticos são necessários para validar esse potencial.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que as sementes e bagas de *Xylopi*a *aromatica* constituem uma fonte relevante de metabólitos secundários com potencial atividade antitumoral. O processo de extração e fracionamento permitiu a obtenção de frações com diferentes rendimentos e perfis químicos, sendo as frações de acetato de etila e butanólica as que apresentaram maior atividade citotóxica frente às linhagens tumorais UMUC3 e J82.

A caracterização preliminar por cromatografia e a comparação com dados da literatura indicam que compostos como cumarinas, terpenóides e flavonoides podem estar associados aos efeitos biológicos observados, reforçando a importância das etapas de fracionamento na prospecção de substâncias bioativas. A determinação dos valores de IC_{50} confirmou a maior potência da fração de acetato de etila, enquanto a fração butanólica também se mostrou promissora do ponto de vista farmacognóstico.

Entretanto, a ausência de seletividade frente à linhagem não tumoral indica que as frações ainda não apresentam perfil adequado para aplicação terapêutica direta. Deve-se considerar, ainda, como limitação do estudo, o uso do modelo *in vitro* bidimensional (2D), que

não reproduz plenamente a complexidade do microambiente tumoral *in vivo*, como interações celulares e influência do estroma tumoral. Conclui-se que a *Xylopia aromatica* apresenta potencial como fonte de compostos com atividade antitumoral, sendo necessários estudos adicionais de isolamento, identificação química e avaliação farmacológica em modelos mais complexos para viabilizar seu desenvolvimento futuro.

8. REFERÊNCIAS

AL-ZALABANI, Abdulmohsen H. et al. *Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. European Journal of Epidemiology*, v. 31, n. 9, p. 811–851, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10654-016-0138-6>.

AMADO, N. G. et al. *Flavonoids: potential wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. Life Sci.* v. 89, n. 15-16, p. 545-554, 2011.

ANTONI, S. et al. *Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. European Urology*, v. 71, p. 96–108, 2017.

ARAI, Satoko et al. *Tolerability and efficacy of neoadjuvant chemotherapy with a tri weekly interval methotrexate, doxorubicin, vinblastine, and cisplatin regimen for patients with locally advanced bladder cancer. Case Reports in Oncology*, v. 11, n. 2, p. 450–460, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1159/000490458>.

ARORA, RAJESH. *Herbal medicine: a cancer chemopreventive and therapeutic perspective.* Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., Delhi, p. 3-41, 2010

BERTOLA, Gabriela Zatti. *Alcaloides como drogas potenciais no tratamento de gliomas: uma revisão.* 44f Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.* Brasília, 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf. Acesso em: 26 maio 2023.

BRAZ, Juliana de Vasconcelos Cerqueira. *Atividade antitumoral de terpenos e mecanismo de ação do limoneno em células tumorais: uma revisão de patentes, revisão sistemática e meta-análise*. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2020.

CARVALHO, P. E. R. *Espécies arbóreas brasileiras*. v. 4. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2010. p. 455–463.

COSTA, K. P. et al. *Atividade antioxidante dos extratos etanólicos e dos óleos essenciais de Xylopia aromatica e Piper nigrum*. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 3, p. 27904–27912, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n3-481. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/26611>. Acesso em: 26 maio 2023.

DEWICK, Paul M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons, 2002.

DYRSKJØT, L et al. (2023). *Bladder cancer*. *Nature reviews. Disease primers*, 9(1), 58. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00468-9>

GOMES, I. N. F. et al. *Alkaloid and phenolic compounds of Xylopia aromatica inhibits tumor growth by down-regulating matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, v. 34, n. 2, p. 599–606, mar. 2021.

FRANCO, D. P. et al. *A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos*. *Química Nova*, v. 44, n. 2, p. 180–197, 2021. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170654>.

GERAN, R. I. et al. *Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems*. *Cancer Chemotherapy Reports*, v. 3, n. 2, p. 1-103, 1972.

HU, X., LI, G., & WU, S. (2022). *Advances in Diagnosis and Therapy for Bladder Cancer*. *Cancers*, 14(13), 3181. <https://doi.org/10.3390/cancers14133181>.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Global Cancer Observatory: Cancer Today – Data Visualization*. Lyon: IARC, 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/bars?mode=population>. Acesso em: 20 fev. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 20 fev. 2025.

KHADHOURI, S. et al. *The identify study: the investigation and detection of urological neoplasia in patients referred with suspected urinary tract cancer – a multicentre observational study*. *BJU International*, v. 128, n. 4, p. 440–450, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/bju.15483>.

KUHLMANN, Marcelo. *Frutos e sementes do Cerrado: espécies atrativas para a fauna*. Volumes I e II, Brasília, 2018. Disponível em: <http://frutosatrativosdocerrado.bio.br/>.

KOPUSTINSKIENE, D. M. et al. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, v. 12, n. 2, p. 457, 2020. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/183337/000937670.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 4 mar. 2026.

LENIS, Andrew T; LEC, Patrick M; CHAMIE, Karim. *Bladder Cancer: A Review*. *Jama*, c. 324, n. 19, p. 1930, 17 nov. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.17598>.

MENDES, Raudiney Frankilin Vasconcelos; XIMENES, Rafael Matos. *Composição química e potencial farmacológico de espécies brasileiras do gênero Xylopia L. (Annonaceae): uma revisão sistemática*. *Cuadernos de Educación y Desarrollo*, v. 17, n. 7, p. e8903, 2025. Disponível em: <https://ojs.cuadernoseducacion.com/ojs/index.php/ced/article/view/8903>. Acesso em: 19 jan. 2026.

MESQUITA, M. L. et al. *Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 123, p. 439–445, 2009.

MUSHTAQ, Jameel; THURAIRAJA, Ramesh; NAIR, Rajesh. Bladder cancer. *Surgery (Oxford)*, v. 37, n. 9, p. 529–537, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.07.003>.

PANDEY, S.; BOURN, J.; CEKANOVA, M. *Mutations of p53 decrease sensitivity to anthracycline treatments in bladder cancer cells*. *Oncotarget*, v. 9, n. 47, p. 28514–28531, 2018.

REIS, Flávia Gabriele dos. *Fingerprinting e anotação rápida de metabólitos secundários das folhas e sementes de Xylopia sericea*. 41 f. Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S. & FERREIRA, F. A. *Estudo fitoquímico de Senna alata por duas metodologias*. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 27, no. 3, p. 507-513, 2009.

ROSA, M. N. et al. *Bioprospecting of natural compounds from Brazilian Cerrado biome plants in human cervical cancer cell lines*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 7, p. 3383, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22073383>.

SAGINALA, Kalyan et al. *Epidemiology of bladder cancer*. *Medical Sciences*, v. 8, n. 1, p. 15, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/medsci8010015>.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. *Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão*. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 7, n. 3, p. 29–35, 2017.

SILVA, G. N.; CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M. F. *Toxicogenomic activity of gemcitabine in two TP53-mutated bladder cancer cell lines: special focus on cell cycle-related genes*. *Molecular Biology Reports*, v. 39, n. 12, p. 10373–10382, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1916-1>.

SILVA, L. E. et al. *Plantas do gênero Xylopia: composição química e potencial farmacológico*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 4, supl. 1, 2015. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_076.

SIMÕES, C.M.O et al. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora, 2016.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. *Assays related to cancer drug discovery*. *Methods in Plant Biochemistry*, v. 6, p. 71-133, 1990.

SUFFREDINI, I. B et al. *In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia*. *Fitoterapia*, v. 78, n. 3, p. 223–226, 2007.

TRAN, L et al (2021). *Advances in bladder cancer biology and therapy*. *Nature reviews. Cancer*, 21(2), 104–121. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00313-1>.