

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**Efeito antitumoral e antiparasitário de frações proteicas presentes no endocarpo de
*Caryocar brasiliense***

Bruna Vilalon Pereira

UBERLÂNDIA
2023

Bruna Vilalon Pereira

**Efeito antitumoral e antiparasitário de frações proteicas presentes no endocarpo de
*Caryocar brasiliense***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Maria Santiago

Co-Orientadora: Carolina de Souza Gardenghi

UBERLÂNDIA

2023

Bruna Vilalon Pereira

**Efeito antitumoral e antiparasitário de frações proteicas presentes no endocarpo de
*Caryocar brasiliense***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Banca examinadora:

Profª. Dra Fernanda Maria Santiago
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Dra. Ana Carolina de Moraes Oliveira Scussel
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Msc. Jhoan David Aguillón Torres
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Uberlândia, 27 de novembro de 2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar, desejo expressar minha sincera gratidão à minha família, com especial reconhecimento às minhas duas queridas tias, Tereza e Elza, pela inestimável assistência que me proporcionaram, por serem o alicerce que sustenta minha jornada e por terem depositado confiança em mim. Além disso, estendo meus agradecimentos à minha irmã Renata, minhas primas Caroline e Deise, bem como ao meu tio João Bosco, pelo apoio que me ofereceram.

Não posso deixar de expressar minha profunda gratidão aos meus pais, Rosanea e Jonas, por terem me ensinado a perseguir incansavelmente meus sonhos. Embora não estejam fisicamente presentes, sei que estão orgulhosos de mim.

Expresso, igualmente, minha gratidão à minha orientadora, a Profa. Dra. Fernanda Maria Santiago, pelos valiosos conhecimentos que generosamente compartilhou comigo. Sua contribuição desempenhou um papel essencial em minha trajetória acadêmica e no desenvolvimento do meu entusiasmo pela pesquisa. Sua conduta, como ser humano, professora, orientadora e pesquisadora, é um exemplo a ser seguido. Serei eternamente grata pela oportunidade concedida e por tudo o que fez por mim.

Agradeço à minha co-orientadora Carolina, pela parceria de experimentos, pelos conselhos, pela compreensão durante os momentos mais desafiadores da minha vida e por me apoiar em todas as ocasiões. Você tem um coração maravilhoso, fico extremamente grata por ter te conhecido.

Não poderia deixar de agradecer a todos os pesquisadores do Laboratório de Imunologia e Parasitologia (LIP), em especial, Ana Paula, Carolina, David e Débora por todos os momentos, por tudo que me ensinaram e por deixarem o final da minha graduação mais leve.

Agradeço também meu psicólogo Bruno, pelo apoio constante ao longo desses anos. Por me auxiliar a enfrentar os desafios que surgiram, celebrar comigo minhas realizações e, sobretudo, por ter me incentivado a persistir em meu sonho, quando em algum momento duvidei de minha capacidade.

Agradeço aos meus amigos que foram importantíssimos na minha formação, em especial Gabriel, Jonathan, Isabelle e Luana, obrigada por estarem nos meus melhores e piores momentos e por permanecerem presentes na minha vida.

À todos que convivi ao longo desses anos de curso, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica.

E por fim, agradeço a Universidade Federal de Uberlândia, por me permitir realizar um sonho.

Efeito antitumoral e antiparasitário de frações proteicas presentes no endocarpo de *Caryocar brasiliense*

1 RESUMO:

A pesquisa de produtos naturais desempenha um papel crucial no avanço do conhecimento e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças de grande impacto, tais sejam elas infecciosas ou crônicas. *Caryocar brasiliense*, conhecido popularmente como Pequi, é um fruto oleaginoso predominante no cerrado brasileiro. Estudos anteriores evidenciaram a presença de propriedades antitumorais, antioxidantes, antiparasitárias, anti-microbianas e fungicidas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade biológica das frações protéicas presentes no endocarpo de *C. brasiliense in vitro*, frente às células tumorais MDA-MB 231 e PC3, e contra taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. As frações proteicas foram obtidas por extração fenólica, seguida de purificação e fracionamento por coluna de gel filtração Sephadex G-75, em três picos denominados I, II e III. O ensaio de hemaglutinação não demonstrou atividade lectínica nas amostras. A avaliação da atividade hemolítica indicou citotoxicidade do extrato bruto do endocarpo em concentrações variando de 300 a 4,68 µg/ml. Quanto aos picos obtidos após cromatografia de gel filtração foram observadas hemólise nas concentrações de 300 e 150 µg/ml para os Picos I e II e hemólise para o Pico III na concentração de 300 µg/ml. A atividade antitumoral foi estatisticamente significativa para as células tumorais MDA-MB 231 quando na presença do Pico I e Pico III demonstrando efeito antitumoral de 67,07% e 73,45% respectivamente. Para o ensaio clonogênico foi observado que todos os picos interferiram na expansão das linhagens tumorais, destacando o Pico I que reduziu em 100% as células PC3 e o Pico III reduziu em 71,42% as células MDA-MB 231. Em relação à atividade antiparasitária, o Pico II de *C. brasiliense* foi a amostra com efeito mais relevante, sendo capaz de inibir a invasão dos taquizoítas de *T. gondii* em 48,38% e consequentemente no processo de proliferação. Com base nos resultados alcançados, pode-se concluir que frações protéicas quando purificadas do fruto de *C. brasiliense* apresentam atividades antitumoral e antiparasitária. Portanto futuros estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos subjacentes a essas atividades, bem como explorar o potencial dessas frações presentes no endocarpo do Pequi como uma fonte promissora de compostos bioativos com possíveis aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*; frações proteicas; antitumoral; antiparasitário

2. INTRODUÇÃO

A pesquisa de produtos naturais para o tratamento de doenças desempenha um papel de extrema relevância na medicina contemporânea. Oferecendo uma fonte inestimável de compostos bioativos, com diversas atividades biológicas, dentre elas: antitumoral, antimicrobiana, antiparasitária, antifúngica, antioxidante e cicatrizante (Ekiert et al., 2020)

Os extratos naturais têm ganhado crescente destaque no âmbito da investigação científica, devido a grande disponibilidade e abundância. Estes recursos podem ser usados na forma de extrato bruto ou compostos isolados, tendo como propósito oferecer novas abordagens terapêuticas para doenças infecciosas e crônicas, promovendo assim avanços significativos na área da saúde (Sasidharan et al., 2011; Abubakar et al., 2020 ; El-Ashram et al., 2021). O Brasil é considerado o território com biodiversidade mais rica do mundo, sendo o cerrado um dos principais biomas que apresenta plantas medicinais com grande potencial terapêutico (Carvalho et al., 2019).

Caryocar brasiliense é um fruto oleaginoso, pertence à família Caryocaraceae, encontrado principalmente no cerrado brasileiro, cujo nome popular é Pequi. A constituição desse fruto é caracterizada pela presença de diferentes porções. O exocarpo, constituindo a porção externa da casca, representa a primeira camada, seguida pelo mesocarpo, que compõe a parte interna da casca. O endocarpo, por sua vez, constitui a camada mais interna, circundando a semente. Adicionalmente, destaca-se a presença de uma camada espinhosa que reveste a semente. Observou-se que as atividades biológicas do óleo de pequi exibem variações consoantes a sua origem de extração, seja proveniente da polpa ou da semente. Tais disparidades revelam-se intimamente correlacionadas com a composição específica do óleo (Faria-Machado et al., 2015; Brito et al., 2022;).

Um estudo demonstrou a atividade hepatoprotetora do óleo de pequi em lesões neoplásicas em modelo murino (Palmeira et al., 2016). Além disso, estudos recentes destacam a capacidade do *C. brasiliense* como agente imunomodulador contra células tumorais de mama, juntamente com sua notável atividade antioxidante, indicando um potencial terapêutico substancial (Ombredane et al., 2022). A investigação centrada em produtos naturais, com ênfase na avaliação antitumoral, desponta como uma área promissora para a concepção de novas estratégias terapêuticas, uma vez que o câncer mantém-se como uma ameaça premente à saúde global. Apesar dos notáveis avanços nas terapias contemporâneas, a quimioterapia continua associada a efeitos colaterais adversos, instigando a necessidade de novas alternativas com propósito de mitigar tais efeitos (Khalifa et al., 2019).

Paralelamente, evidências têm emergido sobre as propriedades antiparasitárias, anti microbianas e fungicidas do *C. brasiliense* (Paula-Júnior et al., 2006; Nogueira et al., 2012). Entretanto, observa-se uma escassez de pesquisas na literatura científica em relação aos estudos que abordam especificamente a atividade antiparasitária do *C. brasiliense*, com foco particular na avaliação de seu potencial contra o parasita *Toxoplasma gondii*. A realização dessas investigações se mostra imprescindível, uma vez que a toxoplasmose, uma infecção alimentar de significativa prevalência, é ocasionada pelo parasita *Toxoplasma gondii*, um organismo intracelular obrigatório com a capacidade de instigar complicações substanciais, especialmente em neonatos e em indivíduos com comprometimento do sistema imunológico (Khan et al., 2022).

O presente estudo visa avaliar as frações protéicas presentes no endocarpo de *C. brasiliense in vitro* contra células tumorais MDA-MB231 e PC3, bem como contra o parasita *T. gondii*, contribuindo assim para a compreensão das potenciais aplicações terapêuticas deste recurso natural.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e preparo do material

Proteínas do endocarpo de *C. brasiliense* foram obtidas pela extração fenólica. Para efetuar a extração, procedeu-se à remoção do endocarpo do pequi *in natura* com auxílio de um bisturi. Subsequentemente, o material foi submetido a um processo de maceração até atingir o estado de pó, em seguida foi adicionado éter etílico até a sua total imersão. Após 12 horas em agitação e completa evaporação da solução, o endocarpo foi pesado e para cada 1 grama de material foi adicionado 10 ml de NaCl a 0,95% + fenol a 0,5% e mantido em agitação por 48 horas a 4°C. Ao término da agitação todo o material foi centrifugado a 5000 rpm por 30 minutos a 4°C, o pellet foi descartado e o sobrenadante dialisado contra NaCl 0,95% durante 48 horas.

3.2 Purificação e dosagens das frações protéicas

Posteriormente a diálise, o extrato bruto de *C. brasiliense* foi submetido ao fracionamento em coluna de gel filtração Sephadex G-75, previamente equilibrada com tampão fosfato salino (PBS). Um total de 100 frações foram coletadas, contendo 1,5 ml e foram lidas num comprimento de onda de 280nm. Para verificar o perfil eletroforético das proteínas presentes nas frações foi realizado gel SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue (Laemmli, 1970) e a partir do resultado as frações foram separadas em 3 picos.

A dosagem das proteínas purificadas foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976), tendo como curva padrão a albumina sérica bovina (BSA).

3.3 Ensaio biológicos

3.3.1 Hemaglutinação e Hemólise

Para verificar a presença de lectinas (proteínas ligantes de carboidratos) e citotoxicidade dos picos obtidos durante a cromatografia em gel filtração foram realizados os testes de hemaglutinação e hemólise, frente às hemácias de camundongos Balb/c obtidas após eutanásia de rotina realizada na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR/UFU). Após a coleta, as hemácias foram lavadas em solução de NaCl 0,95% e centrifugadas a 400g por 5 minutos. Após a centrifugação, as hemácias foram ajustadas para a concentração de 2% em NaCl a 0,95%. Em uma placa de 96 poços com o fundo V, o extrato bruto de *C. brasiliense* e os picos foram diluídos em NaCl 0,95% de forma seriada, partindo da concentração 300 µg/mL diluídos serialmente até a concentração 0,14 µg/mL, e em seguida 25µl de hemácias 2% foram

semeadas em todos os poços e incubadas em temperatura ambiente por 1 hora. Para o controle negativo foram utilizadas somente as hemácias na presença do diluente NaCl 0,95%.

Para a análise do efeito hemolítico das hemácias de camundongos Balb/c após tratamento com as proteínas do endocarpo de *C. brasiliense*, cada poço foi individualmente analisados em microscópio óptico, sendo considerados citotóxicos quando houver ausência das células (hemólise).

3.3.2 Ensaio de MTT para avaliar a citotoxicidade sobre a linhagem celular NIH

Para avaliar a citotoxicidade das proteínas de interesse em células não cancerígenas foi realizado o teste colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio]). Para isso, a linhagem de células fibroblásticas de embrião de camundongo (ATCC: 3T3-NIH CRL 1658) foram utilizadas, cultivadas em garrafas de cultura celular de 25cm² em meio RPMI completo (5% de SFB, 20 mM de HEPES, 100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Inicialmente, as células foram plaqueadas em uma placa de 96 poços, em concentração ajustada para 1×10^5 células/poço em meio RPMI completo durante 24 horas e mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Posteriormente foram adicionadas às células individualmente as frações das proteínas do purificadas do endocarpo, sendo utilizados três picos de interesse, os quais se iniciavam nas concentrações de 600µg/ml e diluídos serialmente até a concentração 4,68 µg/ml, e em seguida foram incubadas por 24 horas. Para o controle negativo, as células foram tratadas apenas com meio RPMI completo. Após este intervalo, foram adicionados 10µl/poço da solução MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich Co, EUA) e 90µl de meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino e as placas foram mantidas em incubação por por 4 horas. Em seguida, as placas foram centrifugada a 500 g por 10 minutos a 37°C e adicionou-se 200 µl/poço de uma solução de SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulphate) e DMF 50% (dimethylformamide) para solubilizar os cristais formados, e após 24 horas feita a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm (Garn et al., 1994).

3.4 Avaliação do efeito antitumoral das frações protéicas sobre as linhagens de PC3 e MDA-MB 231

3.4.1 Ensaio de MTT

Para avaliar a atividade antitumoral, das proteínas pertencentes às frações de *C. brasiliense* foram utilizadas as linhagens celulares PC3 (tumoral de próstata) e MDA-MB 231 (tumoral de mama), pelo método de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil

tetrazólio conforme descrito acima. Entretanto, o tratamento realizado nas células se iniciou na diluição seriada com 100µg/ml até 1,56µg/ml.

3.4.2 Ensaio clonogênico

Esse ensaio foi realizado para avaliar a sobrevivência das células PC3 e MDA-MB 231 pelo seu potencial de proliferação e formação de colônias. Inicialmente as células foram plaqueadas em uma placa de 12 poços na proporção de 500 células/poço, e em seguida foram expostas às proteínas, nas concentrações de 100µg/ml de cada pico. Para o controle da reação foi usado apenas as células na presença do meio RPMI completo e foram mantidas à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade durante 7 dias. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de metanol gelado por 5 minutos, em seguida os poços foram lavados três vezes com PBS e a formação de colônias foram observadas através da coloração com cristal violeta a 1%. A contagem foi realizada em microscópio óptico, sendo considerado 100% de formação de colônias as células apenas tratadas com meio (controle).

3.5 Avaliação antiparasitária

3.5.1 Ensaio de invasão e proliferação

Para avaliar a capacidade de invasão e proliferação da cepa RH de *Toxoplasma gondii*, taquizoítas e a célula hospedeira CCD (ATCC: CCD-1059Sk) foram cultivados em garrafas de cultura celular de 25cm² em meio RPMI completo 2% e 5% respectivamente.

Primeiramente as células CCD foram plaqueadas em placas de 24 poços, sendo 1x10⁵ células por poços durante 24 horas. Posteriormente os parasitos foram tratados individualmente com as amostras desejadas do endocarpo (PI, PII e PIII) na concentração de 100 µg/ml durante 45 minutos em constante agitação a temperatura ambiente. Como controle da reação foram utilizados parasitos tratados somente com PBS. Após o período de tratamento, os parasitos foram centrifugados e lavados uma vez em PBS para a retirada completa das frações de *C. brasiliense*, ajustados na proporção de 2 x10⁵ parasitos/poço e incubados durante 24 horas na presença das monocamadas de CCD a 37°C e 5% de CO₂. Ao término do período, os poços foram lavados com PBS, fixados com metanol gelado durante 10 minutos e por fim os poços foram corados por panótico rápido para visualização em microscopia ótica e contagem. Para o ensaio de invasão, foram contadas aleatoriamente 100 células para determinar a proporção de células invadidas pelo parasita. Em contrapartida, no ensaio de proliferação, dentro do grupo de 100 células previamente infectadas, foi realizada a contagem do número de parasitas presentes nos vacúolos em cada célula, seguida pela determinação da média dessa contagem.

4 Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 9.0.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados da análise antitumoral pelo ensaio de MTT foi realizado o Two-way ANOVA por analisar dois fatores, doses dependentes e tratamento versus controle. Já a atividade antitumoral pelo ensaio clonogênico e a atividade antiparasitária foram analisados por One-way ANOVA e Pós-test de Dunnett. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Purificação e dosagens de proteínas

A amostra do extrato bruto do endocarpo *C. brasiliense* apresentou concentração proteica média de 8,8 mg/mL. Para as amostras obtidas após a coluna de gel filtração G-75 foi observado pelo cromatograma a presença de três picos sendo denominados PI, PII e PII (Fig. 1A).

Quanto ao perfil eletroforético em SDS-PAGE foi observado que o extrato bruto demonstrou componentes peptídicos variando de 220 a 20 kDa (Fig. 1B, Linha 1). O Pico I apresentou uma proteína predominante de 220 kDa (Fig. 1B, linha 2), para o Pico II uma proteína de 60 kDa (Fig. 1B, linha 3) e para o Pico III uma proteína de 30 kDa (Fig. 1B, linhas 4).

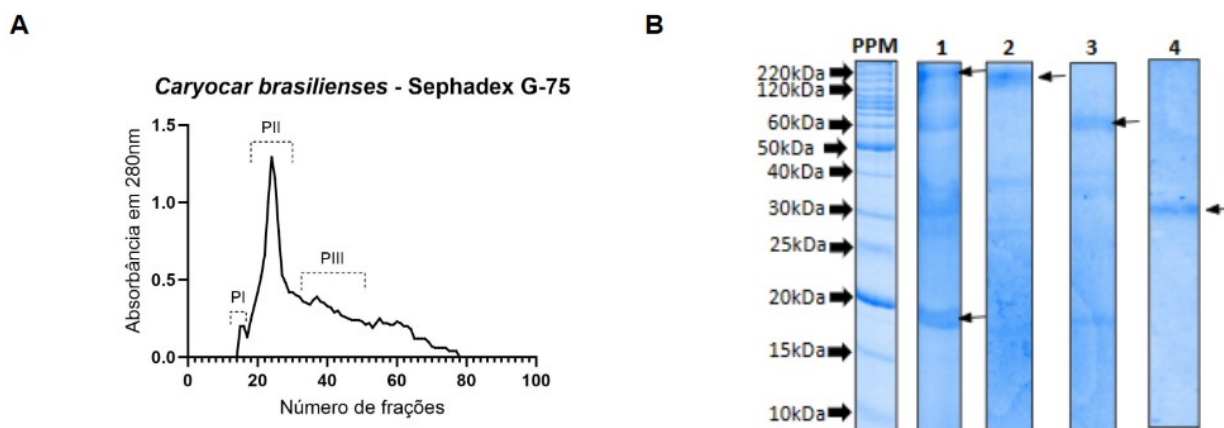


Figura 1 Perfil cromatográfico e eletroforético. (A) Perfil cromatográfico do endocarpo de *C. brasiliense* na coluna de gel filtração Sephadex G-75; Leitura em 280nm realizada em OD. Pico 1 (PI); Pico 2 (PII), Pico 3 (PIII). (B) Perfil eletroforético referente aos picos do endocarpo de *C. brasiliense*, purificado em coluna gel filtração Sephadex G-75. Gel de SDS-poliacrilamida 12% corado com Comassie Blue R-250. PPM: padrão de peso molecular; 1: amostra bruta do endocarpo de *C. brasiliense*; 2: pico I; 3: pico II; 4: pico III.

5.2 Ensaio de Hemaglutinação e Hemólise

O ensaio de hemaglutinação foi conduzido utilizando-se o extrato bruto de *C. brasiliense* e dos picos obtidos por gel filtração, todas iniciando na concentração de 300 µg/ml. O extrato bruto exibiu hemólise em concentrações que variaram de 300 a 4,68 µg/ml, indicando citotoxicidade mesmo em concentrações mais baixas. Os picos I e II, por outro lado, induziram

hemólise nas duas maiores concentrações de 300 e 150 $\mu\text{g/ml}$. O pico III demonstrou hemólise apenas na concentração mais alta de 300 $\mu\text{g/ml}$. Portanto, para hemácias obtidas de camundongos Balb/c foi observado que o extrato bruto apresenta alto grau de citotoxicidade e deste modo para os demais experimentos não foi utilizado. Nenhuma das amostras induziram aglutinação em quaisquer diluições testadas, sugerindo que *C. brasiliense* não possui atividade lectínica (Fig. 2).

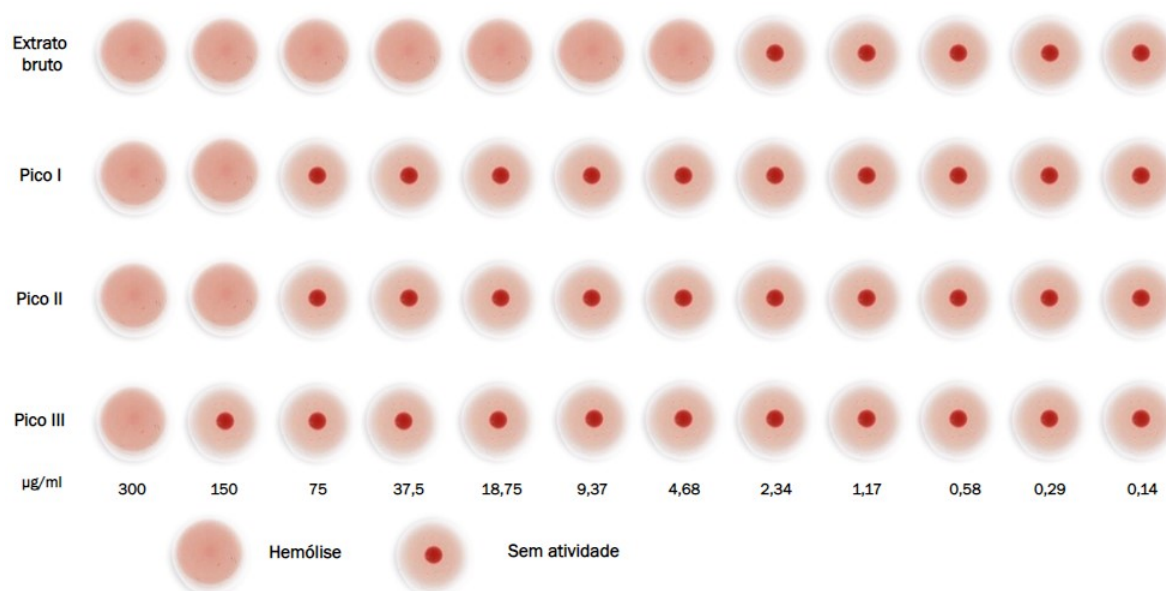


Figura 2 Ensaio de hemaglutinação e hemolítico - Extrato bruto apresentou efeitos hemolíticos (300- 4,68 $\mu\text{g/ml}$); Pico I e II apresentaram hemólise somente nas duas primeiras concentrações (300 e 150 $\mu\text{g/ml}$); Pico III apresentou hemólise na primeira concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$.

5.3 Análise da citotoxicidade sobre a linhagem celular NIH

Para o ensaio de citotoxicidade dos picos obtidos a partir do endocarpo de *C. brasiliense* frente ao fibroblasto NIH foi observado que apenas o Pico III demonstrou ser significativamente citotóxico ($p < 0,05$) na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$, com sobrevida celular de 44% e consequentemente morte celular de 66%. Os demais picos não demonstraram redução estatisticamente significativa na viabilidade nessa concentração, sendo observados apenas uma redução para o PI (10%) e para o Pico II (16%). Quanto à análise da viabilidade celular nas concentrações variando de 300 a 150 $\mu\text{g/mL}$ apenas o Pico I apresentou redução não estatisticamente significativa de 8% (Fig. 3). Com base nos dados anteriormente descritos tanto em relação a atividade hemolítica em hemácias de camundongos Balb/c, bem como no ensaio

de MTT em fibroblastos, os demais experimentos foram realizados apenas com a concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, para todos os picos, garantido assim que não haja comprometimento por efeito citotóxico.

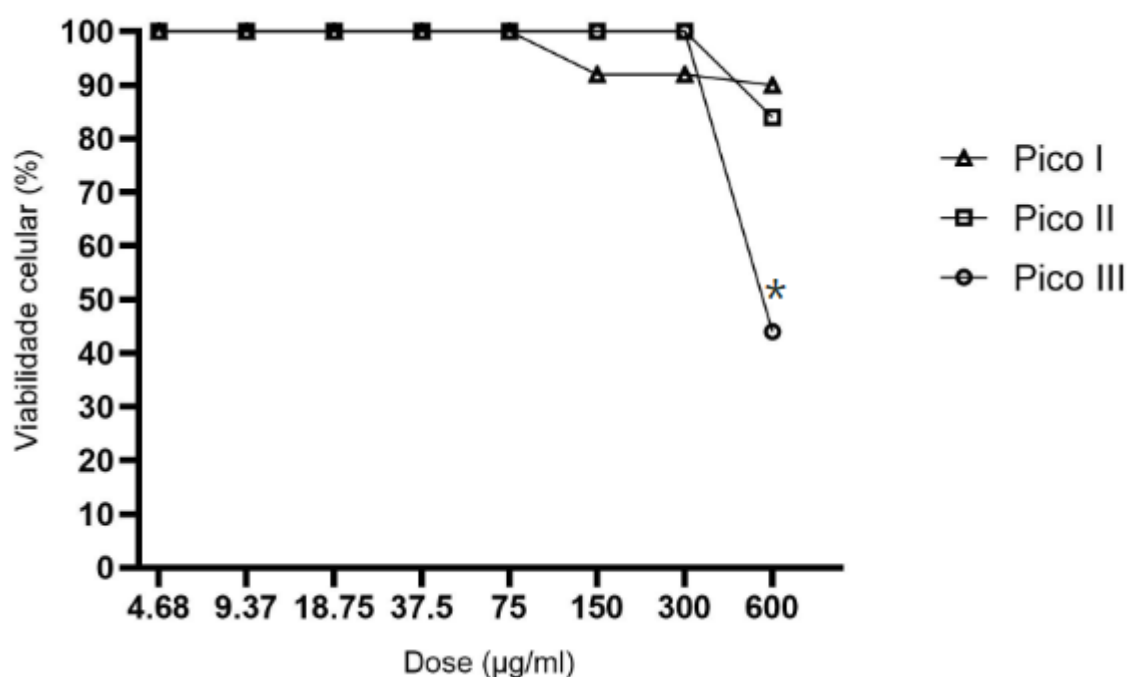


Figura 3 Viabilidade celular - Determinada pelo ensaio de MTT em células NIH tratadas com as frações do endocarpo de *C. brasiliense* nas diluições variando de 600 $\mu\text{g/ml}$ até 4,68 $\mu\text{g/ml}$.

5.4 Atividade antitumoral

5.4.1 Ensaio de MTT

No contexto para avaliar a atividade antitumoral em relação à linhagem PC3, nenhum dos picos testados demonstraram efeito estatisticamente significativo. Apenas foi constatado que o Pico I nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ promoveu mortalidade celular de 5,66% e 5,72% respectivamente (Fig. 4A). Em contrapartida, os resultados foram distintos quando observados frente à linhagem MDA-MB 231 em comparação com a linhagem PC3. Pico I demonstrou atividade antitumoral a partir da concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ sendo dose dependente, a considerar de 38% quando utilizado na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, 43,3% na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e de 67,07% para a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Quanto ao Pico III foi observado que acima de 50 $\mu\text{g/mL}$ a amostra inicia sua atividade antitumoral resultando em 73,45% de morte celular na concentração mais alta de 100 $\mu\text{g/mL}$. Para o Pico II não foi demonstrado nenhum efeito nas células MDA-MB231 (Fig. 4B)

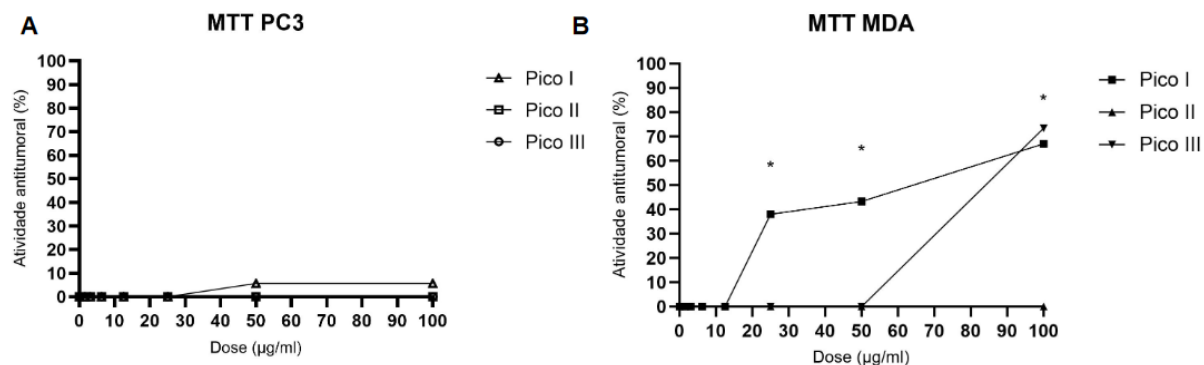


Figura 4 Atividade antitumoral determinada pelo ensaio de MTT em células tumorais tratadas com os picos do endocarpo de *C. brasiliense*. (A) Avaliação antitumoral em células PC3; (B) Avaliação antitumoral em células MDA-MB 231, $p < 0,0001$.

5.4.2 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico, teve como objetivo avaliar a capacidade dos picos de *C. brasiliense* em inibir a proliferação e consequentemente formação de colônias de células tumorais durante 7 dias. No que se refere à linhagem PC3, todas as amostras na concentração de 100 µg/mL restringiram em quase a totalidade a expansão celular. Enquanto o poço controle foi possível observar 279 colônias, nos poços correspondentes aos picos I, II e III, foram registradas respectivamente: a ausência completa de colônias, uma redução de 98,2% (5 colônias) e uma redução de 99,6% (1 colônia) como demonstrado na (Figura 5).

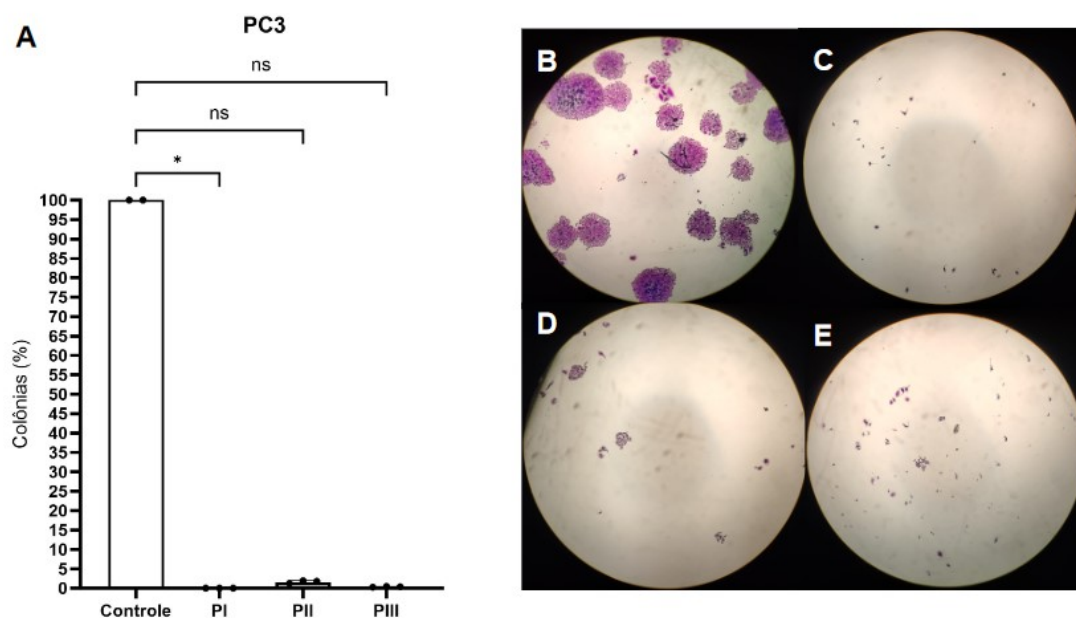


Figura 5 Ensaio clonogênico dos picos de *C. brasiliense* em células tumorais PC3. (A) Gráfico das porcentagens de colônias observadas; **(B a E)** Imagens representativas da formação de colônias, sendo **B:** controle; **C:** Pico I; **D:** Pico II e **E:** Pico III. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA e Pós-test de Dunnett. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes

No que se refere à linhagem MDA-MB 231, todas as amostras demonstraram efeito direto na formação das colônias. À considerar o grupo controle como 100% na capacidade proliferativa das células tumorais (63 colônias), o Pico I demonstrou uma diminuição de 58,7% (26 colônias), Pico II uma redução de 49,2% (32 colônias) e o Pico III uma redução de 71,42% (18 colônias), quando comparadas ao controle (**Figura 6**).

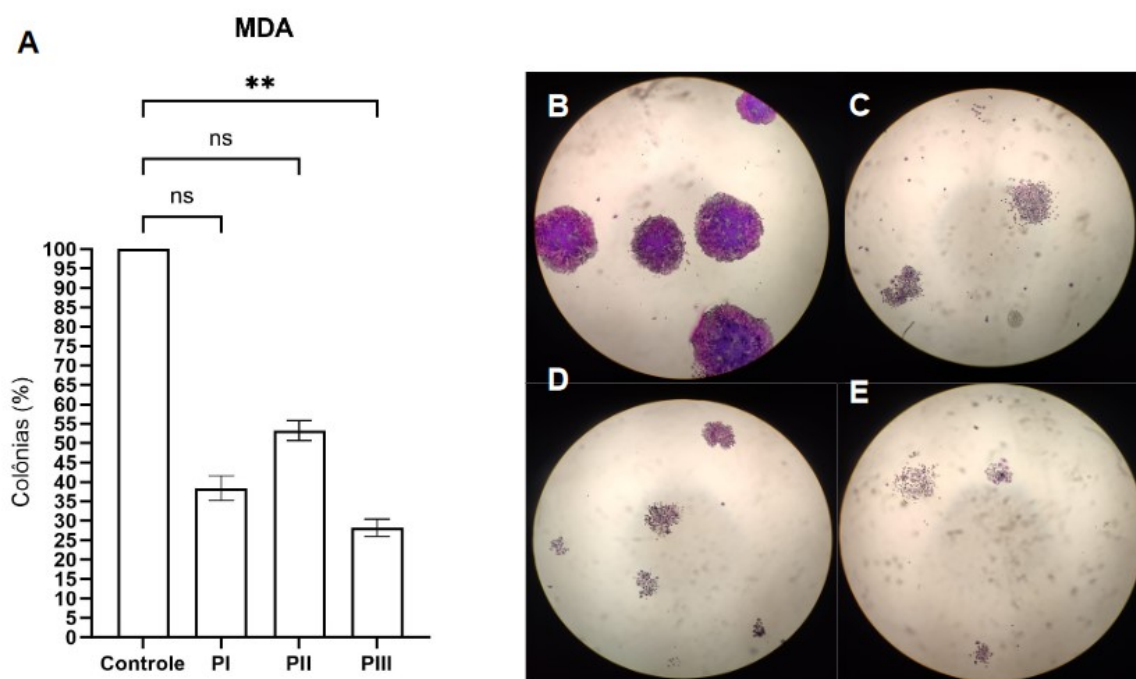


Figura 6 Ensaio clonogênico dos picos de *C. brasiliense* em células tumorais MDA. (A) Gráfico das porcentagens de colônias observadas. (B a E) Imagens representativas da formação de colônias, sendo **B**: controle; **C**: Pico I; **D**: Pico II e **E**: Pico III. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA e Pós-test de Dunnett. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes

5.5 Atividade antiparasitária

Os efeitos de todos os picos em relação aos taquizoítos de *T. gondii* nas células CCD revelaram uma redução na invasão do parasita, em comparação com o grupo controle, mas somente o pico II foi considerado estatisticamente significativo. No grupo controle foram observadas 31 células invadidas pelo parasita (100%), quando submetidas aos picos, constatou-se a invasão de 18 células para o Pico I demonstrando 58,06% de eficácia de invasão, no pico II observou-se 15 células invadidas demonstrando uma capacidade invasiva menor, cerca de 48,38%, e no pico III a capacidade de invasão chegou a 67,74%, sendo observadas 21 células contendo o parasita (**Figura 7A**).

Com relação aos resultados obtidos no ensaio de proliferação parasitária, constatou-se que o pico II demonstrou um melhor efeito inibitório na proliferação em comparação com as demais amostras, porém sem diferença estatística. No grupo controle, a proliferação parasitária foi em média de 5,5 parasitas/célula, Pico I, observou-se uma média de 4,9 parasitas/célula, Pico II média de 2,3 parasitas/célula e Pico III exibiu um aumento na proliferação dos taquizoítos de *T. gondii* atingindo 8,6 parasitas/célula, dados demonstrados na **Figura 7B**.

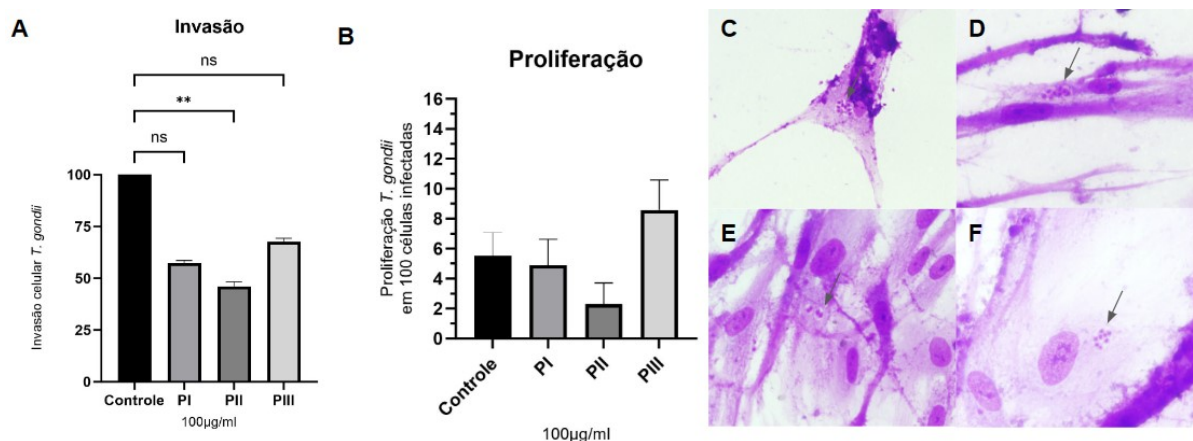


Figura 7 Ensaio de invasão e proliferação de taquizoítos *T. gondii* em células hospedeiras CCD. **(A)** Gráfico do efeito antiparasitário dos Picos de *C. brasiliense* frente a capacidade de invasão do *T. gondii*. **(B)** Gráfico demonstrando o efeito inibitório no processo de proliferação do parasito. **(C-F)** Imagens representativas de células infectadas, sendo **C**: grupo controle; **D**: Pico I; **E**: Pico II; **F** Pico III. A análise estatística foi realizada utilizando one-way ANOVA e Pós-test de Dunnett. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes

6 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos a atividade biológica das frações protéicas presentes do endocarpo de *C. brasiliense* sob células tumorais e formas taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. No presente estudo foi observado que o extrato bruto do endocarpo de *C. brasiliense* promoveu lise total das hemácias em concentrações até 4,68 $\mu\text{g/ml}$, já o pico I, II e III foram citotóxicos somente em concentrações variando de 300 e 150 $\mu\text{g/ml}$. Estudos tem demonstrado que a maioria dos extratos brutos obtidos de produtos naturais demonstram citotoxicidade acentuada em sua configuração não purificada, em contraste, com uma menor citotoxicidade em relação aos compostos isolados (Adebayo et al., 2015; Palharini et al., 2017). Quanto à atividade lectínica, esta é avaliada pela capacidade de proteínas em ligar a carboidratos de origem não imune, facilitando a aglutinação dos eritrócitos (Adamova et al., 2014; Konozy et al., 2022). As frações protéicas presentes no endocarpo de *C. brasiliense* não apresentaram atividade lectínica pois não aglutinaram eritrócitos murinos. Silvestrini e colaboradores (2017), conduziram uma investigação empregando um extrato bruto derivado de sementes de *C. brasiliense*, no entanto, não constatarem a presença de atividade hemaglutinante.

As frações proteicas purificadas do endocarpo de *C. brasiliense* demonstraram atividade antitumoral sendo dose dependente no ensaio MTT na linhagem tumoral de mama,

MDAMB231. Brito e colaboradores (2022) identificaram no extrato derivado do óleo do pequi a presença de atividade antitumoral, sendo caracterizado por sua citotoxicidade em ensaio MTT contra a linhagem celular tumoral de mama, MCF-7. Adicionalmente, a avaliação da atividade antitumoral também se apoiou no ensaio clonogênico, que permitiu uma análise detalhada da habilidade de replicação das células tumorais quando submetidas a uma exposição prolongada às frações purificadas. Em ambas as linhagens celulares tumorais estudadas, os picos obtidos do endocarpo de *C. brasiliense* demonstraram efeito inibitório na proliferação celular. Contudo, na linhagem PC3, foi observado que o pico I apresentou o desempenho mais notável, enquanto na linhagem MDA-MB231, o pico III se destacou como o mais eficaz. Os resultados obtidos a partir do ensaio clonogênico sugerem que as amostras podem ter um efeito predominantemente preventivo, inibindo a proliferação das células tumorais, ao invés de um efeito terapêutico direto. Uma investigação suplementar indicou que o óleo derivado da polpa do *C. brasiliense* pode ser considerado um agente potencial na inibição e supressão da hepatocarcinogênese, exibindo propriedades quimiopreventivas, provavelmente associadas aos compostos antioxidantes presentes no óleo (Palmeira et al., 2016). Além disso, pesquisas recentes utilizando uma nanoemulsão do óleo de pequi evidenciou uma notável atividade antitumoral. Neste estudo, observaram-se alterações significativas nas características celulares, resultando em um aumento substancial na taxa de apoptose das células tumorais. Tais achados indicam o potencial da nanoemulsão do óleo de pequi como uma terapia complementar que poderia ser empregada simultaneamente com abordagens terapêuticas convencionais no tratamento do câncer de mama (Ombredane et al., 2022).

No contexto da atividade antiparasitária para os ensaios de invasão e proliferação foi observado efeito significantemente reduzido quando testado o Pico II. É importante ressaltar que, até o momento, a literatura científica carece de estudos específicos que investiguem o potencial antiparasitário do *C. brasiliense* em relação ao parasita *T. gondii*. Paula-Júnior e colaboradores (2006) demonstraram o efeito antiparasitário do extrato bruto hidroetanólico derivado das folhas do *C. brasiliense*, resultando na erradicação das formas promastigotas do parasita *Leishmania amazonenses*. Além disso, outro estudo, empregando um extrato hidroalcoólico das folhas, revelou um considerável potencial na prevenção do desenvolvimento larval do mosquito *Aedes aegypti*, um vetor capaz de transmitir diversos patógenos infecciosos como Dengue, Chikungunya e Zika vírus (Moraes et al., 2020). Ademais, pesquisas utilizando o extrato aquoso da casca do pequi exibiu notável capacidade de inibir a eclosão de ovos de nematóides do gênero *Haemonchus*, um parasita que afeta animais de interesse econômico

ressaltando, assim, a diversidade de potenciais aplicações terapêuticas do *C. brasiliense* em diferentes cenários de parasitismo (Nogueira et al., 2012;).

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nos experimentos conduzidos neste estudo, foi evidenciada a atividade antitumoral das frações protéicas presentes no endocarpo do *C. brasiliense* frente às linhagens de células MDA-MB 231 e PC3. Essas frações demonstraram a capacidade de inibir a proliferação celular, destacando-se a eficácia de um efeito preventivo em relação a um efeito terapêutico direto. Adicionalmente, as amostras exibiram propriedades antiparasitárias contra o parasita *T. gondii*, resultando na redução da invasão e da subsequente proliferação intracelular em comparação com o grupo controle.

Conclui-se, portanto, que as frações protéicas purificadas do endocarpo de *C. brasiliense* apresentam potencial terapêutico promissor. No entanto, pesquisas futuras são necessárias para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos subjacentes a essas atividades e para explorar seu potencial no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas

8 REFERÊNCIAS

- Adamova, L., Malinová, L., & Wimmerová, M. (2014). New sensitive detection method for lectin hemagglutination using microscopy. *Microscopy research and technique*, 77(10), 841–849. <https://doi.org/10.1002/jemt.22407>
- Adebayo, S. A., Dzoyem, J. P., Shai, L. J., & Eloff, J. N. (2015). The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African. *BMC complementary and alternative medicine*, 15, 159. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0669-5>
- Brito, R. M., Barcia, M. T., Farias, C. A. A., Zambiasi, R. C., de Marchi, P. G. F., Fujimori, M., Honório-França, A. C., França, E. L., & Pertuzatti, P. B. (2022). Bioactive compounds of pequi pulp and oil extracts modulate antioxidant activity and antiproliferative activity in cocultured blood mononuclear cells and breast cancer cells. *Food & nutrition research*, 66, 10.29219/fnr.v66.8282. <https://doi.org/10.29219/fnr.v66.8282>
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Carvalho, J. T. G., Baldivia, D. S., Leite, D. F., Araújo, L. C. A., Espindola, P. P. T., Antunes, K. A., Rocha, P. S., Souza, K. P., Santos, E. L. (2019). Medicinal Plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and Anticancer Potential and Protection against Chemotherapy Toxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 3685264. <https://doi.org/10.1155/2019/3685264>
- Ekiert, H. M., & Szopa, A. (2020). Biological Activities of Natural Products. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(23), 5769. <https://doi.org/10.3390/molecules25235769>
- El-Ashram, S., El-Samad, L. M., Basha, A. A., & El Wakil, A. (2021). Naturally-derived targeted therapy for wound healing: Beyond classical strategies. *Pharmacological research*, 170, 105749. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105749>

Faria-Machado, A. F., Tres, A., van Ruth, S. M., Antoniassi, R., Junqueira, N. T., Lopes, P. S., & Bizzo, H. R. (2015). Discrimination of pulp oil and kernel oil from pequi (*Caryocar brasiliense*) by fatty acid methyl esters fingerprinting, using GC-FID and multivariate analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(45), 10064–10069. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03699>

Garn, H., Krause, H., Enzmann, V., & Drössler, K. (1994). An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. *Journal of immunological methods*, 168(2), 253–256. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90062-0)

Khan, I. A., & Moretto, M. (2022). Immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Current opinion in immunology*, 77, 102226. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102226>

Khalifa, S. A. M., Elias, N., Farag, M. A., Chen, L., Saeed, A., Hegazy, M. F., Moustafa, M. S., Abd El-Wahed, A., Al-Mousawi, S. M., Musharraf, S. G., Chang, F. R., Iwasaki, A., Suenaga, K., Alajlani, M., Göransson, U., & El-Seedi, H. R. (2019). Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. *Marine drugs*, 17(9), 491. <https://doi.org/10.3390/md17090491>

Konozy, E. H. E., & Osman, M. E. M. (2022). Plant lectin: A promising future anti-tumor drug. *Biochimie*, 202, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.08.002>

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Morais, H. L. M. do N., Feitosa, T. C., Rodrigues, J. G. M., Lira, M. G. S., Nogueira, R. A., Luz, T. R. S. A., Silva-Souza, N., Lima, N. M., Andrade, T. de J. A. dos S., & Miranda, G. S.. (2020). Hydroalcoholic extract of *C. brasiliense* Cambess. leaves affect the development of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 53, e20200176. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0176-2020>

Nogueira, F. A., Fonseca, L. D., da Silva, R. B., de Paiva Ferreira, A. V., Nery, P. S., Geraseev, L. C., & Duarte, E. R. (2012). In vitro and in vivo efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. *Parasitology research*, 111(1), 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2843-8>

Ombredane, A. S., Silva, L. R. A., Araujo, V. H. S., Costa, P. L., Silva, L. C., Sampaio, M. C., Lima, M. C. F., Veiga Junior, V. F., Vieira, I. J. C., Azevedo, R. B., & Joanitti, G. A. (2022). Pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) nanoemulsion alters cell proliferation and damages key organelles in triple-negative breast cancer cells in vitro. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 153, 113348. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113348>

Palharini, J. G., Richter, A. C., Silva, M. F., Ferreira, F. B., Pirovani, C. P., Naves, K. S. C., Goulart, V. A., Mineo, T. W. P., Silva, M. J. B., & Santiago, F. M. (2017). Eutirucallin: A Lectin with Antitumor and Antimicrobial Properties. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 136. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00136>

Palmeira, S. M., Silva, P. R., Ferrão, J. S., Ladd, A. A., Dagli, M. L., Grisolia, C. K., & Hernandez-Blazquez, F. J. (2016). Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation* (ECP), 25(4), 299–305. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000187>

Paula-Junior, W. de., Rocha, F. H., Donatti, L., Fadel-Picheth, C. M. T., & Weffort-Santos, A. M.. (2006). Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 16(Rev. bras. farmacogn., 2006 16 suppl), 625–630. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000500007>

Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011;8(1):1-10. Epub 2010 Oct 2. PMID: 22238476; PMCID: PMC3218439.