

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Luana Reis Alvernaz Miraglia da Silva

Estudo bioquímico e atividade biológica *in vitro* do extrato da amora negra

Florianópolis

2023

Luana Reis Alvernaz Miraglia da Silva

Estudo bioquímico e atividade biológica *in vitro* do extrato da amora negra

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Farmacêutico(a).

Orientador(a): Prof.(a), Dr.(a) Maique Weber Biavatti

Coorientador(a): Dr.(a) Thaise Gerber

Florianópolis

2023

Silva, Luana Reis Alvernaz Miraglia da
Estudo bioquímico e atividade biológica in vitro do extrato
da amora negra / Luana Reis Alvernaz Miraglia da Silva ;
orientadora, Maique Weber Biavatti, coorientadora, Thaise
Gerber, 2023.
37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Pectina. 3. Morus nigra. 4. Melanoma. I.
Biavatti, Maique Weber. II. Gerber, Thaise. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Luana Reis Alvernaz Miraglia da Silva

Estudo bioquímico e atividade biológica *in vitro* do extrato da amora negra

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 28 de Novembro de 2023.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof.(a) Maique Weber Biavatti, Dr.(a)

Orientador(a)

Prof. Flávio Henrique Reginatto, Dr.

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Luiz Antonio Escorteganha Pollo, Dr.

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023

RESUMO

O melanoma metastático, um tipo agressivo de câncer de pele, está associado a mutações nos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina. Apesar dos avanços na imunoterapia e terapia-alvo, existe uma resistência ao tratamento, levando à regressão dos pacientes, recorrência e efeitos adversos graves, reduzindo a sobrevida. Extratos vegetais têm sido investigados como agentes antitumorais devido ao potencial antioxidante de compostos naturais. As pectinas, polissacarídeos vegetais, têm papel vital na estrutura celular de plantas e são úteis em diversas indústrias, como na formulação de produtos farmacêuticos, cosméticos e embalagens de alimentos. Apesar da diversidade, todas as pectinas compartilham o ácido galacturônico em sua estrutura principal. Este estudo propõe que as pectinas desempenham um papel importante nas células de melanoma B16F10. Avaliou-se a farinha de amora negra obtida comercialmente, o potencial citotóxico e a viabilidade celular em células de melanoma. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizada para analisar os espectros dos extratos brutos e desesterificados da farinha de amora, demonstrando que os extratos contendo polissacarídeos (bruto e desesterificado) não apresentaram unidades ácidas características, ausência de sinais de carbono de éster ou de ácido carboxílico na região de 170 ppm, bem como ausência de sinais de hidrogênios de carbonos anoméricos característicos de unidades ácidas, como carbono éster ou de ácido carboxílico (170-180 ppm), assim como, também não há sinal de hidrogênio de éster etílico (2,2 ppm) ou metoxila (3,5-3,7 ppm). Em relação a citotoxicidade celular, nenhum dos extratos apresentou toxicidade relevante, o extrato desesterificado mostrou maior viabilidade em células B16F10 (108,06%, na concentração de 15,6 µg/mL) e 3T3 (111,82%, na concentração de 250 µg/mL), enquanto o extrato bruto revelou menor viabilidade celular (78,19%, 62,5 µg/mL em B16F10) e (31,53%, 1000 µg/mL em 3T3) em comparação com o controle (100% tanto em B16F10, quanto 3T3). Os resultados indicam que os tratamentos não interferiram na viabilidade celular nas células de melanoma B16F10, porém, em relação às células 3T3, o extrato bruto apresentou menor viabilidade, indicando apresentar mais compostos além dos polissacarídeos. No entanto, a amostra da farinha de amora adquirida pode não ter extraído todas as unidades ácidas relevantes das pectinas. Portanto, são necessários mais estudos para caracterizar melhor a complexa composição química das pectinas de amora e desesterificar adequadamente as pectinas das amostras de amora.

Palavras-chave: Pectina; *Morus nigra*; Melanoma.

ABSTRACT

Metastatic melanoma, an aggressive type of skin cancer, is linked to mutations in melanocytes, cells responsible for melanin production. Despite the advancements in immunotherapy and targeted therapy, treatment resistance occurs, leading to patient regression, recurrence, severe adverse effects, and reduced survival. Plant extracts are under exploration as antitumor agents due to their potential as natural compound antioxidants. Pectins, plant polysaccharides, play a crucial role in plant cell structure and find utility in various industries such as pharmaceuticals, cosmetics, and food packaging. Although diverse, all pectins share galacturonic acid in their main structure. This study suggests that pectins play a significant role in B16F10 melanoma cells. The commercially obtained blackberry flour, its cytotoxic potential, and cell viability in melanoma cells were evaluated. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was used to analyze the spectra of raw and deesterified blackberry flour extracts, demonstrating that extracts containing polysaccharides (raw and deesterified) did not present characteristic acidic units, absence of ester carbon or carboxylic acid signals in the 170 ppm region, as well as an absence of characteristic anomeric carbon hydrogen signals of acidic units, such as ester or carboxylic acid carbon (170-180 ppm), likewise, there was no signal of ethyl ester hydrogen (2.2 ppm) or methoxyl (3.5-3.7 ppm). Regarding cellular cytotoxicity, neither of the extracts showed relevant toxicity; the deesterified extract showed higher viability in B16F10 cells (108.06%, at a concentration of 15.6 $\mu\text{g/mL}$) and 3T3 cells (111.82%, at a concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$), while the raw extract revealed lower cell viability (78.19%, at 62.5 $\mu\text{g/mL}$ in B16F10) and (31.53%, at 1000 $\mu\text{g/mL}$ in 3T3) compared to the control (100% in both B16F10 and 3T3). The results indicate that the treatments did not affect cell viability in B16F10 melanoma cells. However, concerning 3T3 cells, the raw extract showed lower viability, suggesting the presence of additional compounds beyond polysaccharides. Nevertheless, the acquired blackberry flour sample might not have extracted all relevant acidic compounds from the pectins. Therefore, further studies are necessary to adequately characterize and deesterify the pectins in blackberry samples.

Keywords: Pectin; *Morus nigra*; Melanoma.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 14 |
| 3 OBJETIVO | 16 |
| 4 METODOLOGIA | 17 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 20 |
| 6 CONCLUSÃO | 30 |

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde mundial que engloba mais de 200 doenças, sendo a que causa a segunda maior incidência de mortes da população. Apenas em 2020, foi possível observar uma incidência de aproximadamente 9,9 milhões de mortes da população mundial (SUNG et al., 2021). Devido a este crescimento contínuo, estima-se para 2040 mais de 30 milhões de novos casos mundiais e uma taxa de mortalidade de cerca de 16 milhões. No Brasil, para o mesmo ano, a estimativa é de 995 mil novos casos, com taxa de mortalidade de 470 mil (WHO, 2021).

Apesar da diversidade de neoplasias que acometem a população, um dos mais incidentes é o câncer de pele, que pode ser classificado de duas formas: melanoma ou não-melanoma. O não-melanoma representa 94% do total de casos de câncer de pele e um alto índice de cura, enquanto o melanoma metastático possui o pior prognóstico e maior índice de mortalidade (IBCC, 2018). Destes, apenas 14% dos pacientes sobrevivem por, aproximadamente, cinco anos (MARTHA, 2020). O melanoma metastático é um tipo de câncer de pele decorrente do acúmulo de mutações nos melanócitos – células não-tumorais presentes na epiderme que são responsáveis pela produção de melanina, pigmento que dá sua coloração. Apesar deste tipo de câncer representar apenas 1% de todos os cânceres de pele, é responsável em torno de 90% de todas as mortes, devido à alta capacidade metastática (EDDY; CHEN, 2020).

Como principal fator de risco, para todos os tipos de câncer de pele, está a exposição excessiva à radiação solar ultravioleta (UV). Porém, outros fatores como histórico familiar, idade, gênero, status socioeconômico, cor de pele, olhos e cabelo, bronzeamento artificial, medicamentos ou sistema imune debilitado, também podem estar associados e promover o aumento do risco de desenvolvimento deste câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017; CARR; SMITH; WERNBERG, 2020). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), aproximadamente 80% dos melanomas são causados pela exposição solar desprotegida. As radiações UVB e UVA promovem danos ao DNA, mutações gênicas e proliferação celular anormal, bem como no aparecimento de manchas, sinais ou pintas (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; MARTHA, 2020).

Com relação ao tratamento, uma das primeiras intervenções é a cirurgia de excisão local ampla do tumor primário, considerada a técnica padrão ouro para

tratamento do melanoma (EDDY; CHEN, 2020). Além disso, utiliza-se também comumente a combinação de radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e terapia direcionada, do qual se faz uso de diversos medicamentos aprovados por agências reguladoras nacionais e internacionais (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021). A quimioterapia e a radioterapia, principais tratamentos disponíveis para a população mundial, estão comumente associadas à alta toxicidade e, geralmente, de forma não seletiva. Ou seja, além de agir sobre o tecido tumoral, também têm ação sobre tecidos não-tumorais, atingindo células saudáveis, o que pode resultar em efeitos adversos severos aos pacientes (GONÇALVES RIBEIRO, 2021).

Historicamente, até 2010, os únicos tratamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) eram: o fármaco Dacarbazina e a Interleucina-2 em alta dose (JENKINS; FISHER, 2021; WINDER; VIRÓS, 2017). No entanto, nos últimos 13 anos houve um avanço bem significativo no tratamento para o melanoma, como por exemplo com a aprovação de novos medicamentos, como o Nivolumab, Ipilimumab e o Vemurafenib – advindos de anticorpos monoclonais anti-PD1 e anti-CTLA4. Esses medicamentos desenvolvidos resultam na interferência da interação entre a célula tumoral e a célula do Sistema Imunológico, permitindo a consolidação principalmente de linfócitos T citotóxicos, essenciais no combate ao tumor (LEONARDI et al., 2020). No entanto, apesar dos avanços na imunoterapia e na terapia-alvo, observa-se na clínica uma resistência natural ou adquirida com o passar do tratamento com esses medicamentos, gerando como resultado a regressão dos pacientes com melanoma e maiores chances de apresentar recidiva, grande quantidade de efeitos adversos observados e baixa taxa de sobrevida devido à alta toxicidade (GONÇALVES RIBEIRO, 2021; VIRÓS, 2018; WINDER; RALLI et al., 2020).

Dessa forma, diante desse cenário, surge a necessidade de aprimorar os estudos de novos tratamentos, dos quais estão sendo desenvolvidos e, concomitantemente, a relação entre eles e sua respectiva citotoxicidade tem sido um dos principais focos. Assim, houve um aumento significativo na busca por novas moléculas bioativas, menos tóxicas e mais eficazes contra o melanoma metastático, visto a inviabilidade dos tratamentos atuais, principalmente, devido aos seus efeitos adversos já mencionados e ao alto custo (GORRY; MCCULLAGH; BARRY, 2020; RIBEIRO, 2021). Junto a isso, também se observa o avanço das medicinas alternativas e complementares (MACs), principalmente relacionadas a tratamentos não-convencionais utilizando plantas (MARTHA, 2020; SPADACIO; BARROS, 2007).

As MACs podem ser divididas em três grandes grupos: a medicina tradicional indígena, a medicina afro-americana e as medicinas alternativas derivadas de sistemas médicos altamente complexos (GEWEHR et al., 2017; MARTHA, 2020). Em relação a este terceiro grupo, foi observado que vem sendo bastante empregado em tratamentos no Brasil, onde alguns desses tratamentos se destacaram entre as MACs, sendo institucionalizados e inseridos no Sistema Único de Saúde (SUS). Portanto, a exploração de produtos naturais para a medicina alternativa tem se mostrado essencial para complementar tratamentos com o objetivo de evitar maiores consequências e efeitos colaterais para o paciente.

Nas últimas décadas, a utilização de extratos vegetais como agentes antitumorais tem sido alvo de pesquisas e estudos relacionados a determinação do potencial antioxidante de compostos naturais (MARTHA, 2020; TSALA; AMADOU; HABTEMARIAM, 2013). Polissacarídeos extraídos de fontes naturais, como fungos, algas e plantas, têm mostrado ação antitumoral, sendo pouco ou não citotóxicos e podem ser capazes de modular vias associadas a malignidade tumoral (BELLAN et al., 2020; SONG et al., 2011). Dentre os polissacarídeos investigados, destaca-se neste trabalho as pectinas.

As pectinas são polissacarídeos vegetais heterogêneos estruturais biodegradáveis, biocompatíveis e não-tóxicos, capazes de desempenhar um papel importante na parede celular e nas camadas intercelulares de plantas. Devido a isso, é objeto de interesse para uma variedade de aplicações industriais, como na formulação de produtos farmacêuticos, cosméticos, nutracêuticos e em embalagens de alimentos (BRANDÃO; ANDRADE, 1999; NAGGAR et al., 1992; SUNGTHONGJEEN et al., 1999; ZAITSEVA et al., 2020).

As pectinas são formadas por dezessete diferentes monossacarídeos, organizados em polissacarídeos distintos, a partir de mais de vinte diferentes ligações para formação de uma rede quando unidos, agrupados em diferentes tipos de cadeia, constituídas por ácidos urônicos, hexoses, pentoses e metilpentoses. Diversas unidades estruturais podem estar substituídas por metanol, ácido acético e ácidos fenólicos (Gawkowska et al., 2018).

De modo geral, os frutos são responsáveis pelas principais fontes de pectinas e, apesar deste grupo de polissacarídeos ser amplo e diversificado, todas as pectinas apresentam em comum o ácido galacturônico na sua cadeia principal. Estruturalmente, esses polissacarídeos podem apresentar até quatro subestruturas

pécticas distintas: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana-I (RG-I), xilogalacturonanas e ramnogalacturonana-II (RG-II), onde, geralmente, a HG representa aproximante 65%, sendo a mais abundante, e a RG-II a menos presente. As homogalacturonanas são homopolissacarídeos compostos por moléculas de ácido galacturônico unidas por ligações do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ (CANTERI et al., 2012). Essas unidades podem estar na apresentação de metil-esterificação, em maior ou menor grau, dependendo da fonte de onde são extraídas (ZHANG; XU; ZHANG, 2015). As pectinas são classificadas de acordo com o esse grau de metil-esterificação (DE), que pode ser de alto grau (HM) quando apresentam mais de 50% das ramificações representadas por metil-éster na estrutura química, e de baixo grau (LM) quando apresentam menos de 50% (BRANDÃO; ANDRADE, 1999; RIBEIRO, 2021).

Essas características estruturais das pectinas, principalmente das homogalacturonanas, permitem que, em condições adequadas, haja a formação de géis ou soluções com diferentes viscosidades. Isso depende basicamente de cinco fatores: concentração de pectina (e do grau de metil-esterificação da pectina presente), a concentração de açúcar, a participação de agentes ligantes, a temperatura e o pH da solução. Isso interfere diretamente na formação de emulsões, na tensão superficial, estabilização do tecido e seu efeito mecânico característico da formação do gel (MÜLLER-MAATSCH et al, 2014). Quando a solução contém pectinas HM, altos níveis de açúcar e um pH < 3,5, há a formação de ligações de hidrogênio e ação de forças hidrofóbicas que resultam em um gel estável. Já quando a solução tem maior quantidade de pectinas LM, íons Ca^{+2} e um pH próximo de 8,5, provavelmente os grupos carboxila livres estarão em maior concentração e a interação com os íons cálcio favorecerá a formação de géis mais compactos (GAWKOWSKA; CYBULSKA; ZDUNEK, 2018; RIBEIRO, 2021). A acetilação, assim como a metilação, diminui a afinidade da pectina pelos cátions, o que tem grande consequência na capacidade de gelificação da pectina. Além disso, tem um efeito sobre a atividade de superfície, estabilidade da emulsão e viscosidade. Os ésteres de ácido ferúlico desempenham um papel significativo na parede celular vegetal porque formam ligações entre polissacarídeos e proteínas (MÜLLER-MAATSCH et al, 2014). A capacidade de formar de géis tem grande valor na indústria de alimentos, sendo amplamente utilizadas como estabilizantes de sucos naturais e agentes gelificantes na produção de geleias e gelatinas (NAQASH et al., 2017).

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido amplamente utilizada para estudar a pectina e, em geral, os carboidratos dos alimentos em nível estrutural, sendo uma técnica não destrutiva capaz de caracterizar amostras de forma simultânea, qualitativa e quantitativamente, envolvendo a determinação do grau de metilação, acetilação e ferulização de pectinas isoladas. Os ésteres presentes na pectina são hidrolisados em NaOH/D₂O e o metanol, ácido acético e ácido ferúlico resultantes podem ser diretamente medidos por RMN em tempo de análise reduzido em comparação com métodos convencionais baseados em cromatografia ou titulação. (MÜLLER-MAATSCH et al, 2014).

Além de todas essas características e interações estruturais, além do seu valor econômico, as pectinas vêm sendo intensamente estudadas com relação a sua atividade biológica, destacando-se aqui seu potencial citotóxico em células isoladas de diferentes tipos de câncer, como câncer de cólon, leucemia e melanoma (HAYASHI; GILLEN; LOTT, 2000). Existe também a relação entre o grau de metil-esterificação da pectina e seu potencial antitumoral (GONÇALVES RIBEIRO, 2021). Estudos indicam que quanto menor o grau de metil-esterificação, mais promissor é o potencial citotóxico (JIANG; ELIAZ; SLIVA, 2013; PRADO et al., 2019).

O uso de pectina cítrica modificada (MCP) – uma pectina de baixo grau de metil-esterificação – na pesquisa de diversos tipos de câncer, como câncer de próstata, de pulmão, de fígado e de cólon apresentou resultados satisfatórios na modulação de diversas evidências de progressão tumoral como morte e proliferação celular (HAO et al., 2013; PRADO et al., 2019). Na literatura, há um estudo *in vitro* e *in vivo* utilizando um padrão de pectina cítrica modificada comercial (MCP) onde foi possível observar que houve redução da proliferação pulmonar de células de melanoma da linhagem B16F10, junto com o bloqueio da adesão dessas mesmas células de forma não citotóxica (INOHARA; RAZ, 1994; GONÇALVES RIBEIRO, 2021). Em outro estudo *in vivo*, foi possível perceber que a MCP também foi capaz de reduzir a metástase hepática de câncer de cólon, da linhagem CT-26 em camundongos nas concentrações de 1%, 2,5% e 5% em água potável (peso / volume) (LIU et al., 2008).

Como consequência desses e outros estudos relacionados a isso, procura-se conhecer como funcionam as interações entre as pectinas e o microambiente tumoral, bem como a proporção do potencial de ação dessas moléculas como inibidoras do crescimento tumoral. Uma das principais conclusões está relacionada ao potencial de interação das pectinas compostas por galactose com a galectina-3. As galectinas

representam uma classe de proteínas pertencentes à família das lectinas, das quais fazem parte de diversos processos celulares, como adesão, reconhecimento e sinalização (GONÇALVES RIBEIRO, 2021). Em células tumorais, inclusive no melanoma, é possível observar uma taxa expressiva principalmente de galectinas 1 e 3 (ELOLA et al., 2018). Isso se deve ao fato de que os carboidratos presentes na estrutura de galectinas reconhecem as pectinas, por meio de sinais regulatórios, realizando uma ligação entre as duas, impedindo que a galectina fique no seu estado livre e seja capaz de exercer as suas funções pró-tumorais, como supressora da resposta imune, pró-metastática, pró-migratória, pró-angiogênica e estimuladora de crescimento (CARDOSO et al., 2016; GONÇALVES RIBEIRO, 2021).

No Brasil, a espécie *Morus nigra L.* é conhecida popularmente como amora, amoreira, amoreira-preta, amoreira negra ou sarça mora e é uma espécie vegetal arbustiva de porte ereto ou rasteiro que produz frutos agregados de sabor ácido a doce-ácido e coloração negra (SHOEMAKER, 1978). É reconhecida como uma planta com origem na Ásia, frutificando com maior intensidade e abundância, sobretudo na Ásia Menor e estando plenamente aclimatizada no Brasil, onde vem se expandindo nas regiões Sul e Sudeste do país (Chen et al., 2006). A amora negra “*in natura*” é uma fruta nutritiva que geralmente contém 85% de água, 10% de carboidratos, onde o teor de açúcares totais é de 6,64 g/ 100 g de frutos frescos e o de pectina é de aproximadamente 0,76 g/ 100 g. Além disso, é rica em vitaminas do complexo B, vitamina A, além de compostos fenólicos como antocianinas, taninos, quercetina, ácido gálico e ácido elágico, do qual estão associados com o seu potencial efeito antioxidante (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; WANG; LIN, 2000).

Diante disso, o presente estudo tem como hipótese que as pectinas têm um importante papel na atividade biológica em células de melanoma B16F10. Devido a isso, o objetivo é avaliar o perfil fitoquímico da farinha de amora negra e verificar o potencial citotóxico frente a sua atividade biológica em células de linhagem de melanoma.

2 JUSTIFICATIVA

O melanoma é um tipo de câncer de pele maligno extremamente metastático. Se o melanoma está caracterizado ainda como tumor primário, sua excisão promove uma taxa de sobrevivência maior que 5 anos em mais de 90% dos pacientes. Quando metastizado, as opções mais pertinentes de tratamento para os pacientes são quimioterapia, radioterapia, terapias alvo e imunoterapia. No entanto, além dessas terapias possuírem um alto custo, também apresentam diversos efeitos adversos ao paciente, como erupções cutâneas, inflamação de diversos órgãos, náuseas, dores de cabeça, podendo também induzir resistência após um período de uso e serem dependentes de um quadro imunológico e genético que varia de paciente para paciente. A junção de todos esses fatores com o potencial impacto causado pela doença nas famílias, é comum observar também consequências psicossociais ao paciente e àqueles que estão ao seu redor. Devido a dificuldade de tratamentos e terapias ideais e eficazes que pacientes que apresentam melanoma e outros tipos de cânceres apresentam, surge a necessidade, desde a segunda metade do século XX, de mais e novos estudos que comprovem o potencial de polissacarídeos extraídos de fontes naturais como coadjuvantes no tratamento. Pois, assim, haveria nenhuma ou pouca resistência farmacológica e atingiria as células tumorais de forma mais direta, específica e segura, com menor citotoxicidade e efeitos adversos aos pacientes (DABA; EZERONYE, 2003; GONÇALVES RIBEIRO, 2021; ZHANG et al., 2007).

Dessa forma, a ciência percorre na busca e identificação de compostos mais seletivos e com maior acessibilidade aos pacientes. Dentre esses compostos, sugere-se que os polissacarídeos possam agir na modulação das vias de malignidade essenciais para a regressão tumoral, como angiogênese, imortalidade replicativa, sustentação do sinal proliferativo, ativação de invasão e metástase (GONÇALVES RIBEIRO, 2021). As pectinas são exemplos de polissacarídeos ácidos presentes em paredes celulares de plantas e conhecidas comercialmente por desempenharem atividades físico-químicas importantes para diferentes nichos de indústrias e com potencial de apresentar atividade antimelanoma, considerando-se estudos prévios em outros modelos que evidenciaram efetividade. Junto a isso, foi observado na literatura a correlação do grau de metil-esterificação da pectina com a sua atividade citotóxica. Assim, avaliar as concentrações e estrutura química semelhantes às aquelas encontradas na literatura é o ponto inicial do estudo de suas atividades citotóxicas,

visto que outros polissacarídeos já descritos e que apresentaram essa capacidade também modulam outras dinâmicas de malignidade associadas à regressão tumoral, como diminuição da capacidade invasiva e migratória das células tumorais (GONÇALVES RIBEIRO, 2021).

Em um trabalho realizado por Gazzi et al. (2020), foi possível construir um gel de pectina e incorporá-lo com nanocápsulas contendo fármacos específicos em sua estrutura, fazendo com que haja interação *in vitro* com células tumorais de melanoma (SK-MEL-28) e resultando em modificações significativas de parâmetros de malignidade e auxiliando no tratamento desse tipo de câncer, representando uma possibilidade para aprimorar o tratamento de pacientes oncológicos.

Dessa forma, este presente estudo tem por finalidade avaliar o potencial citotóxico e a viabilidade celular *in vitro* do extrato bruto (extrato A) e desesterificado (extrato B) da farinha de amora em linhagem de melanócito murino B16F10 e não tumoral de fibroblastos 3T3, com o objetivo de avaliar se, ao retirar grupos metil-éster, a pectina apresentaria efeitos citotóxicos no melanoma. Com o intuito de verificar se o grau de metil-esterificação é importante para a atividade desta pectina, neste trabalho ela será utilizada na forma desesterificada e comparada com a pectina original. Devido a origem natural desse polissacarídeo, bem como sua alta biodisponibilidade e interesse comercial e industrial, cuja presença é conhecida em extratos de amora negra.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a viabilidade celular do extrato bruto (extrato A) e desesterificado (extrato B) da farinha de amora (*Morus nigra L.*).

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a. Avaliar por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) o extrato bruto (extrato A) e desesterificado (extrato B) da farinha de amora para determinar o grau de desesterificação das amostras;

- b. Avaliar a viabilidade celular *in vitro* sobre a citotoxicidade do extrato bruto (extrato A) e desesterificado (extrato B) da farinha de amora em linhagem de melanócito murino B16F10 e não tumoral de fibroblastos murinos 3T3.

4 METODOLOGIA

4.1 MATÉRIA-PRIMA

4.1.1 Identificação botânica e local do cultivo das biomassas (farinha)

As biomassas de cultivos orgânicos de Amora Negra (*Morus nigra L.*) foram adquiridas da empresa Macça Desidratados Ltda (Fraiburgo/SC), vendidas comercialmente como Farinha de Amora®.

4.1.2 Processamento do material vegetal

Para a obtenção do extrato aquoso (EA) da farinha de amora negra, a cada 1 g de farinha de amora foram adicionados 100 mL de água destilada. O conteúdo foi agitado (em agitador magnético) por 5 min e aquecido em banho-maria (50°C, 20 min), seguido de filtração sob vácuo com papel filtro (\varnothing 0,5 mm) e recuperação do filtrado, i.e., EA, sendo este conservado a -80°C. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1.3 Extração da pectina presente na farinha de amora

Para a extração das pectinas da farinha de amora, foi seguido o protocolo de Gerber (2019), onde foram pesados 1 g de farinha de amora e adicionados em 20 mL de água deionizada (50 mg/mL a 90°C). A extração foi aquosa à quente por 2 h. Esperou-se até atingir a temperatura a 60°C e foi adicionado na solução extrativa oxalato de amônio (0,1 g e aguardado 2 h) - 0.5%/2h, a 60°C e passada 1 h da inclusão do oxalato, foi adicionado à solução extrativa, NaEDTA (0,2 g por mais 1 h) - 1%/1h, a 60°C. Isso resultou na amostra de extrato bruto (extrato A). Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1.4 Desesterificação da pectina bruta da farinha de amora

Para a desesterificação da pectina, foi seguido o protocolo de Gonçalves Ribeiro (2021), que utilizou-se hidróxido de sódio (NaOH) 0,5M. A pectina do extrato bruto (extrato A) foi solubilizada em água destilada (50 mg/mL) por 30 minutos a 50°C em agitador magnético. Em temperatura ambiente, adicionou-se o agente redutor borohidreto de sódio até a solução atingir pH 11 e, então, o NaOH 1M (em água destilada) foi adicionado, resultando na concentração final de NaOH de 0,5M. A solução foi agitada novamente por 30 minutos e adicionou-se ácido acético até atingir pH 6.

Após isso, a solução foi centrifugada (5000 rpm/25 min). O precipitado foi coletado e submetido à diálise em água corrente à temperatura ambiente, por 24 h, em membranas de exclusão de tamanho de 12–14 kDa (Spectra Por®), contra 10 volumes de água. Isso resultou no extrato desesterificado (extrato B). A amostra dialisada foi coletada e congelada em -80°C. Cada material foi liofilizado (por 2 dias) e os rendimentos foram determinados e expressos em porcentagem (%) com base no peso da farinha seca de amora. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1.5 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos extratos bruto (extrato A) e desesterificado (extrato B) da farinha de amora

A análise estrutural foi realizada em um equipamento Bruker Fourier 300, no qual as amostras foram solubilizadas em água deuterada, adquiridos espectros de ^1H e ^{13}C bem como seus mapas de correlação bidimensionais, nas frequências de 300 MHz e 75 MHz, respectivamente. Este experimento foi realizado no Laboratório RMN, no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular de melanoma de camundongo (B16F10) e de fibroblastos murinos (3T3) foram mantidas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementada com soro fetal bovino (SFB) (10%), contendo streptomocina/penicilina (10 mL/L) e bicarbonato de sódio (3,7 g/L). As células foram

cultivadas em placas de cultura e armazenadas em estufa incubadora (ultrafase HF212 UV) a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi substituído a cada 3 dias. Os ensaios de cultura celular foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2.1 Avaliação da citotoxicidade através da viabilidade celular

As células das linhagens B16F10 e 3T3 foram inoculadas em placas de cultura de 96 cavidades na densidade de 1×10^4 células/cavidade e mantidas por 24 h em estufa incubadora (37°C e 5% de CO₂) para garantir a adesão celular. Após, o meio de cultura foi substituído por meio novo contendo os tratamentos com o extrato bruto (extrato A) e desesterificado (extrato B) nas concentrações (3,9 a 1000 µg/mL) por 24 h. Após os períodos de tratamento, 10 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio) (MTT) foram acrescentados a cada cavidade (5mg/mL). Três horas após, o MTT foi removido e substituído por 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram mantidas sob agitação por 30 min, em temperatura ambiente, protegidas da luz. A leitura espectrofotométrica dos resultados foi realizada em um leitor de microplaca, à 540 nm. Os valores expressos em percentual de células viáveis foram obtidos de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \text{Abs da amostra} \times 100 / \text{Abs controle negativo}$$

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) complementada por teste de comparação múltipla de Dunnet ou de Tukey, quando necessário. Valores de *P* menores que 0,05 serão considerados estatisticamente significativos. Os dados serão analisados com o suporte do software GraphPad Prism © 6 (GraphPad, EUA) e os resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DO EXTRATO A E EXTRATO B DA FARINHA DE AMORA

As pectinas cítricas são reconhecidas como uma molécula altamente complexa de cadeias lineares de ácido galacturônico. Diversas unidades estruturais podem estar substituídas por metanol, ácido acético e ácidos fenólicos. Os açúcares podem existir nas formas furanosídicas ou piranosídicas e com diferentes anômeros (α ou β), com diversos tipos de ligações entre os monômeros, tais como $\alpha(1\rightarrow4)$, $\alpha(1\rightarrow5)$, $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ e $\beta(1\rightarrow6)$. Essas variações na composição, especificamente no grau de metoxilação e esterificação, podem afetar as propriedades físicas e funcionais das pectinas

Após análise dos espectros de RMN (^1H e ^{13}C) da pectina bruta (extrato A), não foi observado o sinal característico do grupamento metil éster (3,58 e 57,8 ppm respectivamente), este sim foi observado intensamente na amostra de extrato B, da qual foi submetida a reação de desesterificação utilizando borohidreto de sódio.

Conforme observado nos resultados obtidos, é possível concluir que, nas pectinas brutas do extrato A de farinha de amora, não foi possível identificar sinais de carbono éster ou de ácido carboxílico (170-180 ppm), assim como, também não há sinal de hidrogênio de éster etílico (2,2 ppm) ou metílico (3,5- 3,7 ppm), característicos das pectinas (representados nos espectros das figuras 1 a 4). Isso pode acontecer durante o processo de extração das amoras, pois, podem ocorrer variações nas características químicas, como foi o caso. A amostra da farinha do presente estudo foi adquirida através de um fornecedor, do qual não temos acesso ao processo extrativo utilizado por ser um segredo industrial. Dessa forma, é possível que não tenham sido extraídos os compostos ácidos de interesse, conforme observadas nas figuras (1 a 4), caracterizando a amostra bruta como um polímero de açúcar não ácido.

Em relação à amostra do extrato B de farinha de amora, como foi realizado o processo de desesterificação com a presença de borohidreto de sódio, houve um processo de redução e, conseqüentemente, purificação da amostra, onde o NaBH_4 doa um íon hidreto (H^-) ao carbono do grupo carbonílico, formando um possível intermediário tetraédrico (GONÇALVES RIBEIRO, 2021).

Desta forma, aparentemente não ocorreu a desesterificação completa conforme previsto, não sendo possível calcular a % da desesterificação deste polissacarídeo, não se pode afirmar que o processo de desesterificação tenha sido eficiente, podendo ser evidenciado uma possível esterificação acidental com o ácido acético adicionado. Por se tratar de polissacarídeos de extrema complexidade e estrutura, são necessários mais estudos sobre a caracterização para as amostras em questão.

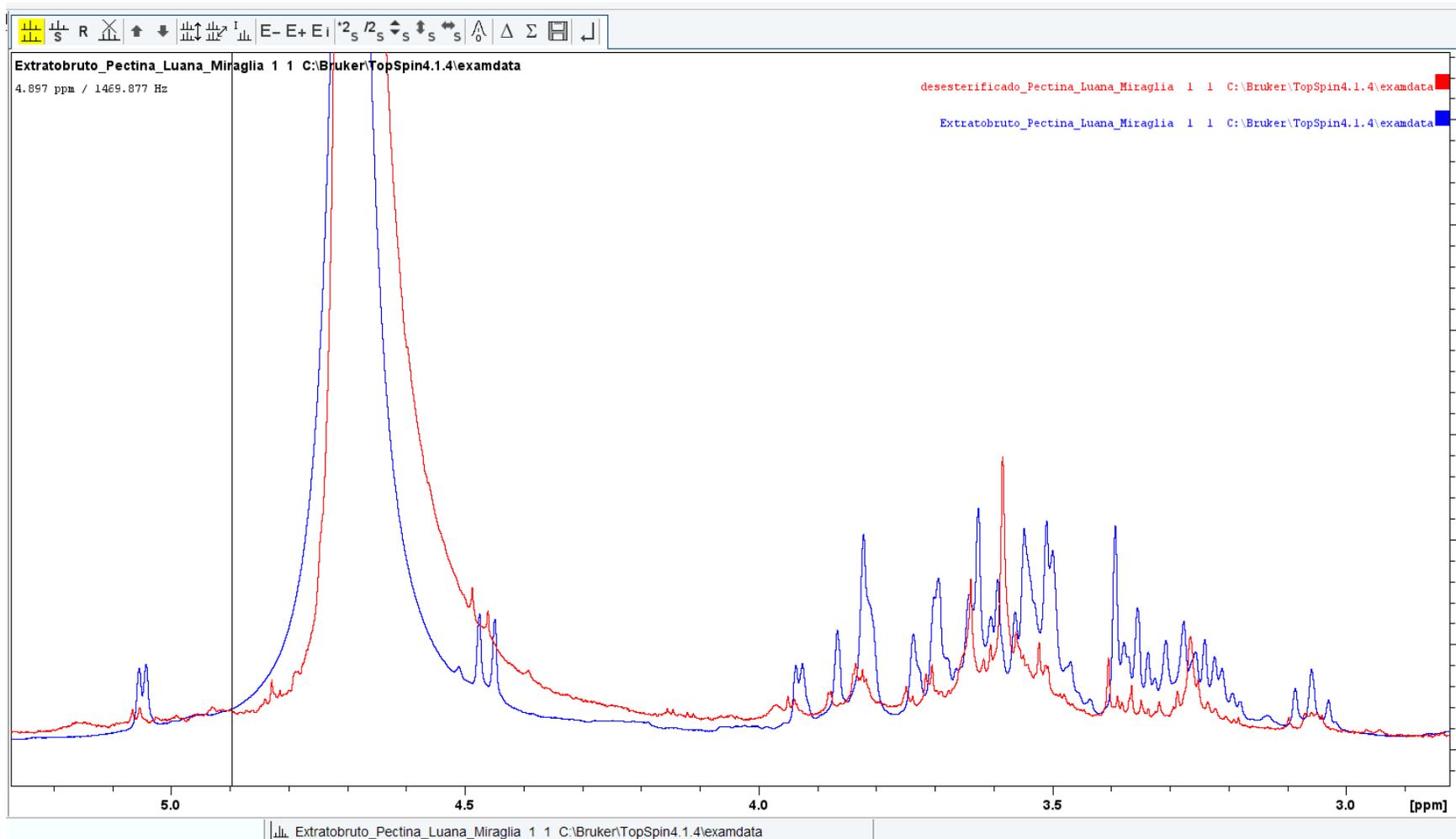
Na literatura, não foi possível encontrar outros trabalhos que abordam sobre os processos de desesterificação de pectinas, principalmente em amora, somente um estudo de Gonçalves Ribeiro (2021), que analisa o processo de desesterificação química da pectina do maracujá, onde verificaram redução da proliferação de células de melanoma (B16F10) nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL, caracterizada como uma homogalacturonana com baixo grau de metil esterificação. A autora observou que o grau de metil-desesterificação (DE) deste polissacarídeo era de apenas 5,8%, contrastando com o DE de 95% da pectina extraída da casca do maracujá, comprovando a eficiência do processo de desesterificação. No presente estudo, este fato não pode ser observado por conta de não ocorrer a desesterificação dos polissacarídeos (observado nas figuras 1 a 4), sendo que foi realizada a mesma reação com borohidreto de sódio. Abaixo tem-se um resumo dos sinais diagnósticos esperados em RMN de ^{13}C normalmente descritos em literatura para pectinas, e que não estão presentes na farinha analisada neste trabalho (Figura 2):

- Ácido Galacturônico (Componente Principal da Pectina): Normalmente apresenta um sinal característico em torno de 176-178 ppm.

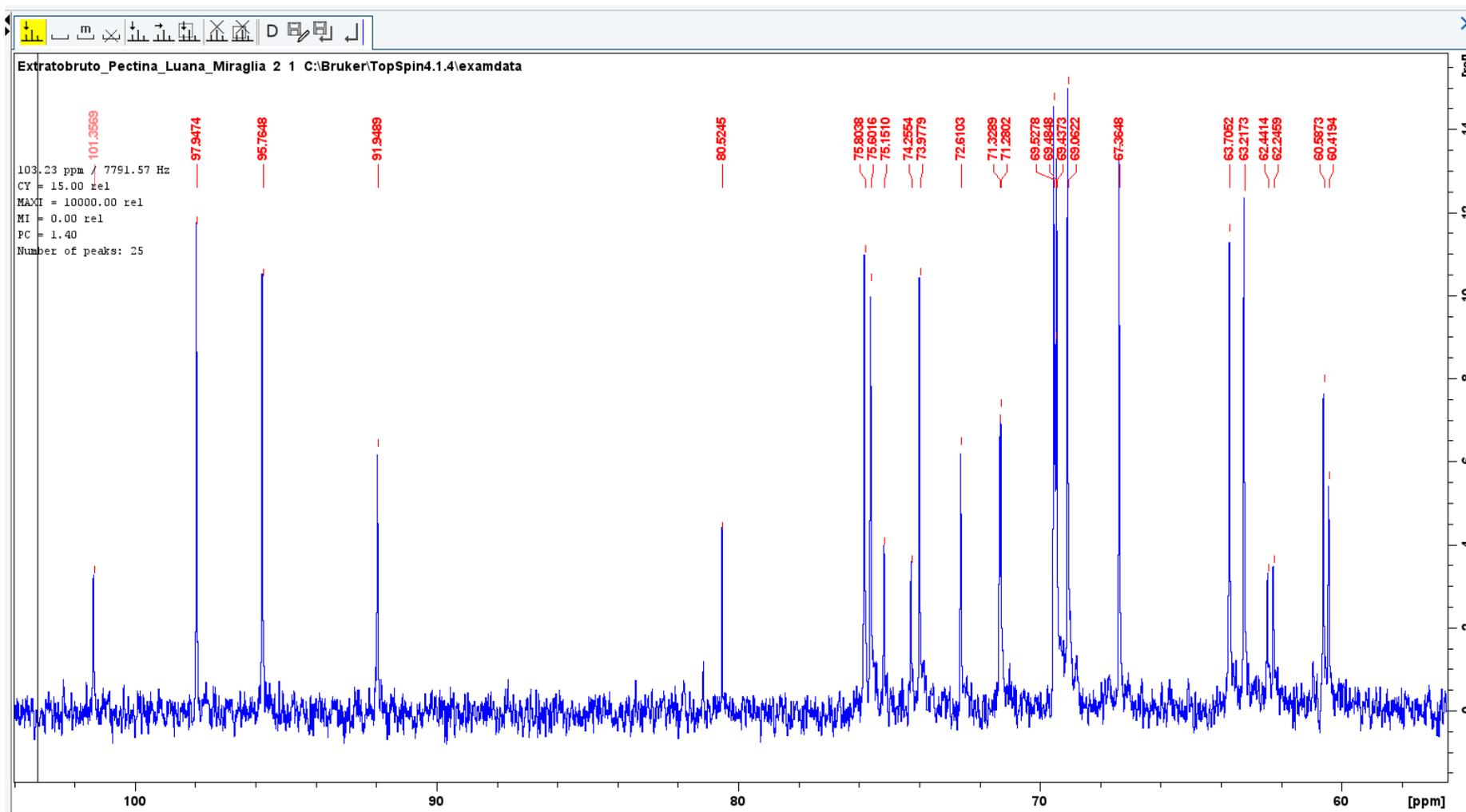
- Galactose e Arabinose: Os deslocamentos químicos para estes açúcares podem variar dependendo da configuração e da posição no açúcar, mas em geral, os carbonos anoméricos são encontrados na faixa de 100-105 ppm.

Já com relação ao extrato B, foi possível encontrar sinais de carbono e hidrogênio (172 e 57,8 correlacionando com 3,57 ppm) conforme imagem 03, que evidenciam a formação de éster metílico, dos quais não são observados na imagem 04, do extrato A.

Figura 01: Comparativo entre os espectros de ^1H RMN (D₂O, 300 MHz) expandidos (região de 3 -6 ppm) do extrato A (azul) e extrato B (vermelho) da farinha de amora.

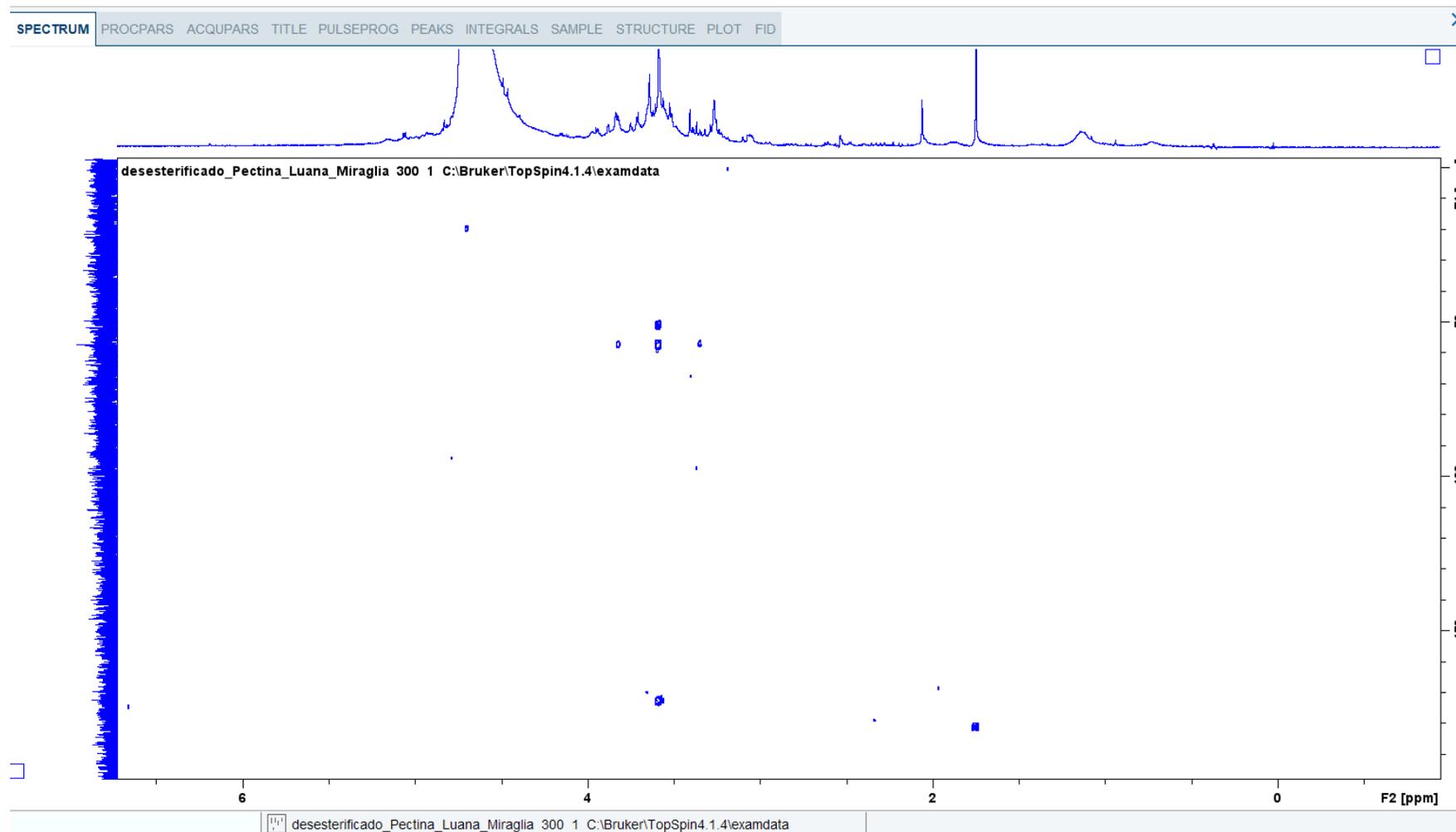


Fonte: Elaboração própria.

Figura 02: Espectro de ^{13}C RMN (D $_2\text{O}$, 75 MHz) do extrato A da farinha de amora.

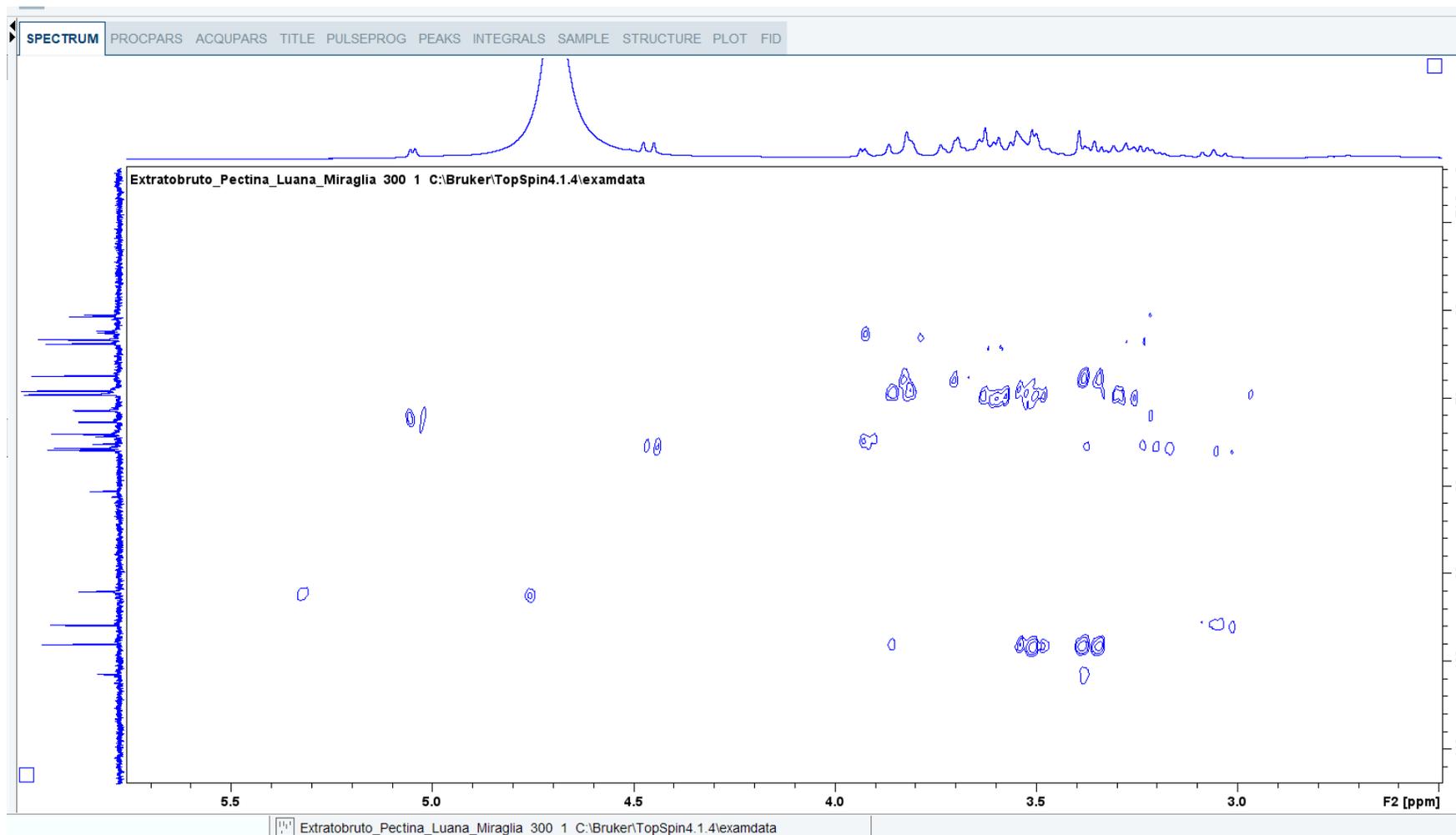
Fonte: Elaboração própria.

Figura 03: Mapa de correlação HSQC ampliado do extrato B da farinha de amora, evidenciando a formação de éster metílico.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 04: Mapa de correlação HMBC ampliado do extrato A da farinha de amora, evidenciando os carbonos anoméricos e a ausência de correlações características de resíduos ácidos.



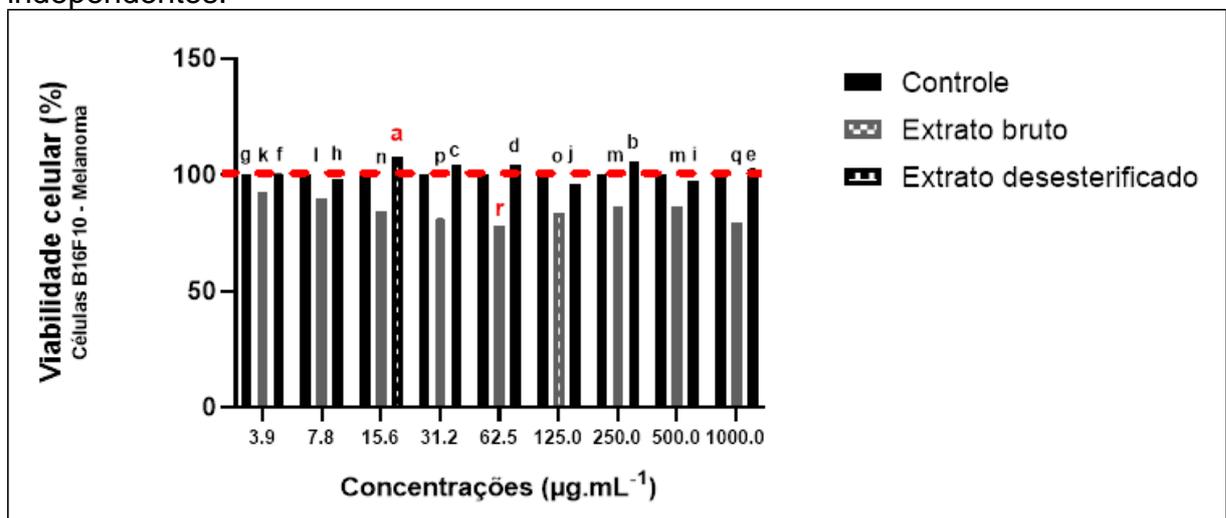
Fonte: Elaboração própria.

5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE ATRAVÉS DA VIABILIDADE CELULAR

5.2.1 Linhagem celular de melanoma (B16F10)

Para realizar a avaliação da citotoxicidade, foi utilizado a viabilidade celular onde a linhagem de células B16F10 foram expostas a concentrações de 3,9 – 1000 µg/mL do extrato A e extrato B, por um período de incubação de 24 horas (Figura 05). Os resultados indicaram a ausência de baixos percentuais de viabilidade celular entre os tratamentos. Pode-se observar que, o extrato B apresentou maiores percentuais de viabilidade em relação ao extrato A. A concentração de 15,6 µg/mL do extrato B foi a mais evidente entre os tratamentos (108,06%, $p < 0,05$). Já o tratamento de 62,5 µg/mL do extrato A foi o que apresentou menor percentual (78,19%) de viabilidade celular.

Figura 05: Efeito do extrato A e extrato B da farinha de amora, nas concentrações de (3,9 – 1000 µg/mL) sobre a viabilidade celular da linhagem de melanoma (B16F10), após 24 horas de tratamento, consoante ao método colorimétrico MTT. Os resultados estão expressos como valores médios \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

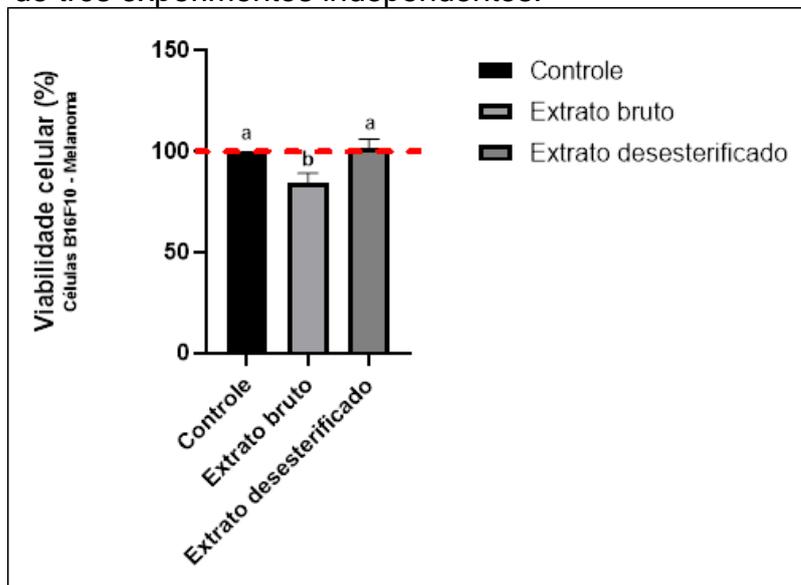


Fonte: Elaboração própria.

Por se tratar de um polímero de açúcar não ácido, evidenciado pelas análises de RMN do presente estudo, o extrato A evidenciou menor percentual de viabilidade celular. Por isso, que as pectinas são moléculas altamente complexas e é um grande desafio acomodar toda informação disponível em um único modelo estrutural (Gazzi et al., 2020).

A fim de realizar uma análise comparativa entre o extrato A e extrato B da farinha de amora, sobre a viabilidade celular em células de melanoma B16F10, foi possível observar na Figura 06 que o extrato A foi o que apresentou menor percentual (84,60%) de viabilidade celular em relação ao controle e o extrato B (100% e 101,86%, respectivamente).

Figura 06: Efeito do extrato A e extrato B da farinha da amora, sobre a viabilidade celular da linhagem de melanoma (B16F10), após 24 horas de tratamento, consoante ao método colorimétrico MTT. Os resultados estão expressos como valores médios \pm desvio padrão de três experimentos independentes.



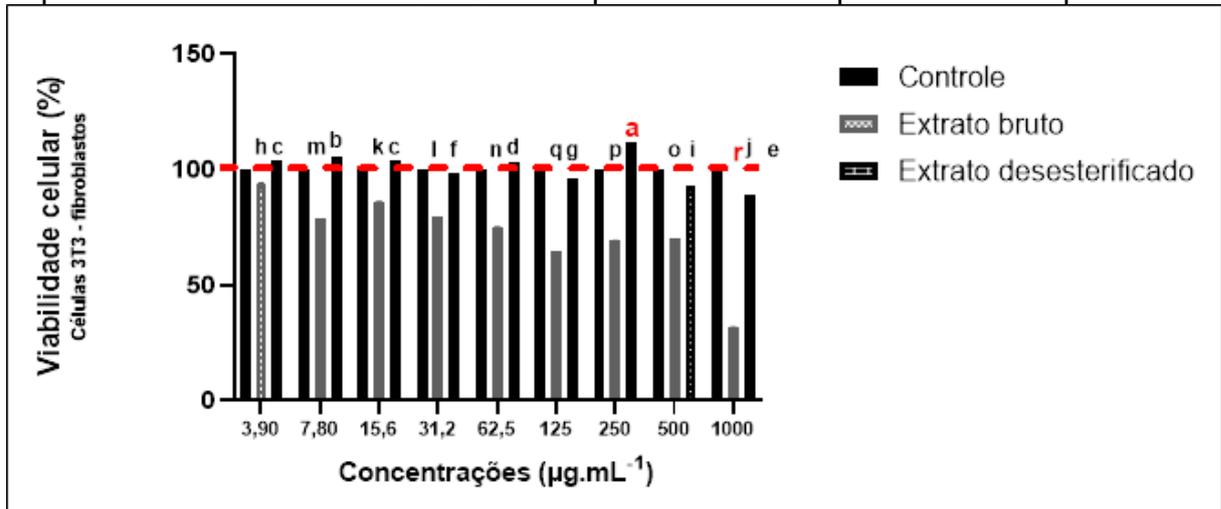
Fonte: Elaboração própria.

5.3.2 Linhagem celular de fibroblastos (3T3)

Para realizar a avaliação da citotoxicidade, foi utilizado a viabilidade celular onde a linhagem de células de fibroblastos (3T3), foram expostas a concentrações de 3,9 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato A e extrato B da farinha de amostra, por um período de incubação de 24 horas (Figura 07). Nota-se que o extrato B nas células 3T3 apresentaram maiores percentuais de viabilidade celular que o extrato A da farinha de amora. A concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato B foi o que apresentou a maior viabilidade celular (111,82%) e a maior concentração 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato A, foi a que apresentou o menor percentual (31,53%) de viabilidade celular.

Figura 07: Efeito do extrato A e extrato B da farinha da amora, nas concentrações de (3,9 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a viabilidade celular da linhagem de fibroblastos (3T3), após

24 horas de tratamento, consoante ao método colorimétrico MTT. Os resultados estão expressos como valores médios \pm desvio padrão de três experimentos independentes.



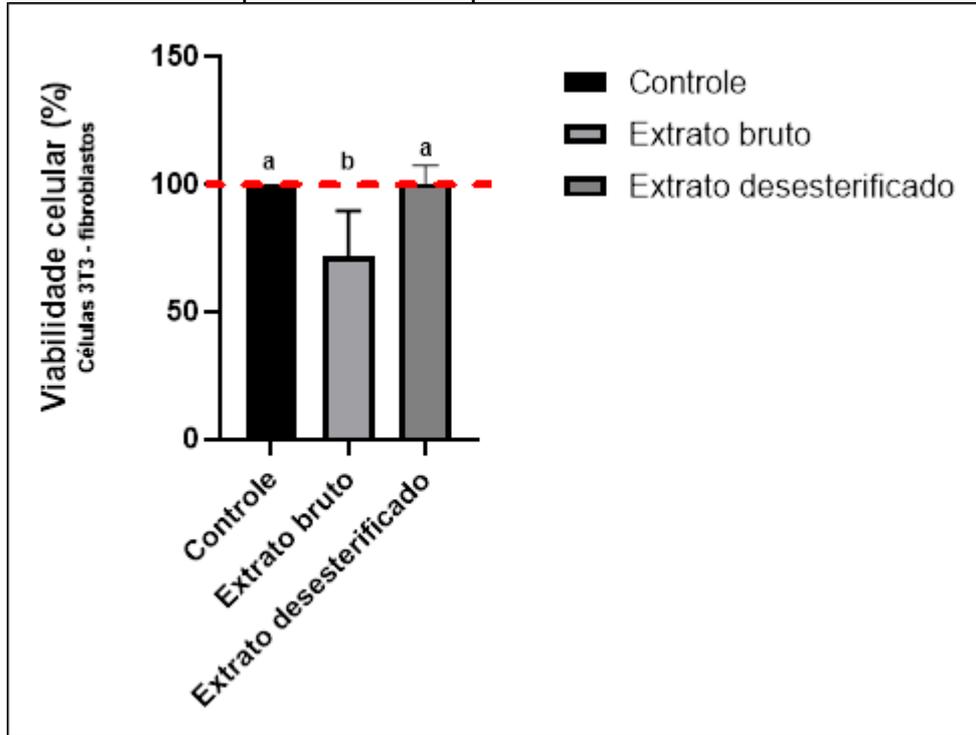
Fonte: Elaboração própria.

Nota-se mais uma vez que as pectinas que passaram pelo processo de desesterificação (extrato B) apresentaram maiores percentuais de viabilidade celular. O extrato de farinha de amora, com a presença de borohidreto de sódio, promove uma redução e, conseqüentemente, a purificação da amostra. Devido a isso, este extrato tenha sido mais eficiente para a viabilidade celular das células de fibroblastos. Costa Amaral (2018), avaliou frações pécicas de polpa de gabioba associadas ao efeito citotóxico em células de glioblastoma humano (U251-MG) e em células não tumorais (NIH 3T3) e verificou que ambas as frações obtidas da polpa da gabioba induziram citotoxicidade em células U251-MG (19,55-37,65% de inibição da viabilidade celular) quando avaliadas pelos métodos de MTT, após 48h de tratamento nas concentrações de 10-400 µg mL⁻¹. Em contraste, tanto GW quanto GWP-FP-S não foram citotóxicas para células NIH 3T3 nas condições testadas. A caracterização estrutural das frações pécicas de polpa de gabioba associadas ao efeito citotóxico em células de glioblastoma humano contribuem para valorização da espécie bem como sua preservação.

A fim de analisar entre o extrato A e extrato B da farinha de amora, sobre a viabilidade celular em células de fibroblastos 3T3, foi possível observar na Figura 08, que o extrato A foi o que apresentou menor percentual (72,11%) de viabilidade celular em relação ao controle e o extrato B (100% e 100,53%, respectivamente).

Figura 08: Efeito do extrato A e extrato B da farinha da amora, sobre a viabilidade celular da linhagem de fibroblastos (3T3), após 24 horas de tratamento, consoante ao

método colorimétrico MTT. Os resultados estão expressos como valores médios \pm desvio padrão de três experimentos independentes.



Fonte: Elaboração própria.

As modificações químicas nas pectinas são efetuadas principalmente através do tratamento com diferentes pHs, envolvendo um tratamento alcalino (que provoca reações de β -eliminação, despolimerizando a cadeia e desesterificando as regiões de HG), seguido de tratamento ácido (que remove preferencialmente monossacarídeos neutros, na ordem, primeiro arabinose, seguido por galactose e ramnose, levando a despolimerização das regiões ramificadas da pectina) (LECLERE, 2013; MORRIS et al., 2013; ZHANG; XU; ZHANG, 2015).

Para estudar os efeitos benéficos de plantas medicinais, torna-se imprescindível na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos em modelos celulares, a fim de determinar as doses ideais não tóxicas para estudos *in vitro* e *in vivo* (MOCELIN et al., 2021). A linhagem celular de fibroblastos 3T3 é muito bem caracterizada e utilizada como um modelo *in vitro* de resposta biológica da pele. Esta linhagem tem algumas das funções celulares semelhantes aos fibroblastos da derme humana, que representam um importante papel na manutenção dessa camada da pele (BAPTISTELLA, 2020). Por isso, é importante investigar os efeitos citotóxicos, e seu potencial biológico.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos do presente estudo, pode-se dizer que:

- Os espectros de RMN (^1H e ^{13}C) do extrato A da farinha de amora, não foi observado o sinal característico do grupamento metil éster (3,58 e 57,8 ppm respectivamente), e este foi observado no extrato B, da qual passou pelo processo de desesterificação.
- Em relação à amostra B do extrato de farinha de amora, como foi realizado o processo de desesterificação com a presença de borohidreto de sódio, houve um processo de redução e, conseqüentemente, purificação da amostra.
- Os resultados indicaram que as células de melanoma murino B16F10 se mantiveram viáveis entre os tratamentos analisados (extrato A e extrato B).
- Em relação às células 3T3, o extrato A apresentou menor viabilidade, indicando apresentar mais compostos além dos polissacarídeos.
- Serão necessários mais estudos sobre a caracterização e desesterificação de pectinas em amostras de amora.

REFERÊNCIAS

- ABERA, B. Medicinal plants used in traditional medicine by Oromo people, Ghimbi District, Southwest Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 10, n.
- AMARAL, S. C. Purificação, Caracterização Química E Efeito Citotóxico Em Células De Glioblastoma Humano De Pectinas Da Polpa De Gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa Berg*). 2018. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná - UFPR.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2017. Atlanta, 2017. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics>. Acesso em: 17 de maio de 2023.
- ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 243, de 26 de julho de 2018, define as referências para especificações de ingredientes fontes de nutrientes, substâncias bioativas e enzimas para constituintes utilizados na composição de suplementos alimentares.
- AZEREDO, H. M. C. Fundamentos de estabilidade de alimentos. Embrapa Agroindustrial Tropical. Fortaleza, 195, 2004.
- BAPTISTELLA, G. B. Síntese e caracterização de polioxovanadatos funcionalizados com potencial aplicação no tratamento do Diabetes mellitus. Dissertação de Mestrado pela Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba/PR. p. 1-126, 2020.
- BELLAN, D. L. et al. Non-Cytotoxic Sulfated Heterorhamnan from *Gayralia brasiliensis* Green Seaweed Reduces Driver Features of Melanoma Metastatic Progression. *Marine Biotechnology*, v. 22, n. 2, p. 194–206, 2020.
- BELLAN, D. L. et al. Green does not always mean go: A sulfated galactan from *Codium isthmocladum* green seaweed reduces melanoma metastasis through direct regulation of malignancy features. *Carbohydrate Polymers*, v. 250, n. August, p. 116869, 2020.
- BHATIA, S., TYKODI, SS., THOMPSON JA., Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. National Institutes of Health. 2009.
- BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. *Polímeros*, v. 9, n. 3, p. 38–44, 1999.
- CANTERI, M. H. G. et al. Pectin: From raw material to the final product. *Polímeros*, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.
- CARDOSO, A. C. F. et al. Galectin-3 determines tumor cell adaptive strategies in stressed tumor microenvironments. *Frontiers in Oncology*, v. 6, n. MAY, p. 1–12, 2016.

CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surgical Clinics of North America*, v. 100, n. 1, p. 1–12, 2020.

CHEN, P. N.; CHU, S.C.; CHIOU, H. L.; KUO, W. H.; CHIANG, C. L e HSIEH, Y. S. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutnoside and cyanidin 3-glucosidem exhibited an inhibitory affect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters*, v. 235, n. 2, p. 248-259, 2006.

CLEMES, S., BEIRITH, A., ZENI, A., Avaliação de polifenóis e capacidade antioxidante de seis espécies da Mata Atlântica. *Scientia Plena*, 2015.

DABA, A. S.; EZERONYE, O. U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, n. 12, p. 835–847, 2003.

EDDY, K.; CHEN, S. Overcoming immune evasion in melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 23, p. 1–48, 2020.

ELOLA, M. T. et al. Galectins: Multitask signaling molecules linking fibroblast, endothelial and immune cell programs in the tumor microenvironment. *Cellular Immunology*, v. 333, p. 34– 45, 2018.

EMRAN, T. B., FAHADUL I., SAIKAT M., SHYAMJIT P., NIKHIL N., ZIDAN K., RAJIB D., DEEPAK C., ROHIT S., CLARA M. G. L., and et al. 2022. "Pectin: A Bioactive Food Polysaccharide with Cancer Preventive Potential" *Molecules* 27, no. 21: 7405.

GAWKOWSKA, D.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. *Polymers*, v. 10, n. 7, 2018.

GAZZI, R. P. et al. New pectin-based hydrogel containing imiquimod-loaded polymeric nanocapsules for melanoma treatment. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 10, n. 6, p. 1829–1840, 2020.

GERBER, T. Perfil químico dos extratos secos de erva-mate (*Ilex paraguariensis a.st. -hil.*) e amora (*Morus nigra L.*) e avaliação in vitro sobre seus efeitos na atividade antidiabética. 2019, p.120. Projeto de tese (Doutorado), Curso de Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

GEWEHR, R. et al. Sobre as práticas tradicionais de cura: subjetividade e objetivação nas propostas terapêuticas contemporâneas. *Psicologia USP*, 2017.

GORRY, C.; MCCULLAGH, L.; BARRY, M. Economic Evaluation of Systemic Treatments for Advanced Melanoma: A Systematic Review. *Value in Health*, v. 23, n. 1, p. 52–60, 2020.

HAO, M. et al. Comparative studies on the anti-tumor activities of high temperature and pH modified citrus pectins. *Food & Function*, v. 4, p. 960-971, 2013.

HAYASHI, A.; GILLEN, A. C.; LOTT, J. R. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in balb-c mice. *Alternative Medicine Review*, v. 5, n. 6, p. 546–552, 2000.

INOHARA, H.; RAZ, A. Effects of natural complex carbohydrate (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. *Glycoconjugate Journal*, v. 11, n. 6, p. 527–532, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE CONTROLE DO CÂNCER (IBCC), 2018. Tipos de câncer. Disponível em <http://www.ibcc.org.br/tipos-de-cancer>. Acesso em 18 de maio de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2006. A situação do câncer no Brasil. Disponível em <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//situacao-cancer-brasil.pdf>. Acesso em 18 de maio de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2017. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em 18 de maio de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2020. Câncer de pele: saiba como prevenir, diagnosticar e tratar. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/noticias/cancer-de-pelesaiba-como-prevenir-diagnosticar-e-tratar>. Acesso em 18 de maio de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). O que é câncer? 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 18 de maio de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estatísticas de câncer, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 18 de maio de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Tratamento do câncer, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento>. Acesso em 18 de maio de 2023.

JENKINS, R. W.; FISHER, D. E. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 141, n. 1, p. 23–31, 2021.

JIANG, J.; ELIAZ, I.; SLIVA, D. Synergistic and additive effects of modified citrus pectin with two polybotanical compounds, in the suppression of invasive behavior of human breast and prostate cancer cells. *Integrative Cancer Therapies*, v. 12, n. 2, p. 145–152, 2013.

KUSKOSKI, E.; MARTA et al. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em polpa de frutas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. 2005, vol.25, nº 4, pp.726-732.

LACOUTURE, M.; SIBAUD, V. Toxic Side Effects of Targeted Therapies and Immunotherapies Affecting the Skin, Oral Mucosa, Hair, and Nails. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 19, n. s1, p. 31–39, 2018.

LECLERE, L.; CUTSEM, P. V.; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH- or heatmodified pectin. *Frontiers in Pharmacology*. v. 4, p. 1-8, 2013.

LECLERE, L.; FRANSOLET, M.; CAMBIER, P.; BKASSINY, S. E.; TIKAD, A.; DIEU, M.; VINCENT, S. P.; CUTSEM, P. V.; MICHIELS, C. Identification of a cytotoxic molecule in heat-modified citrus pectin. *Carbohydrate Polymers*. v. 137, p. 39-51, 2016.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (Review). *International Journal of Oncology*, v. 57, n. 3, p. 609–618, 2020.

LIU, H. Y. et al. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World Journal of Gastroenterology*, v. 14, n. 48, p. 7386–7391, 2008.

LUZ, K. T. V. Atividade antimelanoma de pectinas da ameixa e do maracujá. Dissertação (Mestrado) Curso de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

MARTHA, G. Cultivo celular in vitro: Um estudo citotóxico e principais contaminantes celulares. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Morus nigra* L. (AMOREIRA), 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/2017/arquivos/MonografiaMorusnigra.pdf>. Acesso em: 30 de maio de 2023.

MOCELIN, L. C., RODRIGUES, K. S., BRITO, M. G., DA SILVA, I. K., GRAMS, K. C., ZAMBRA, A. L., BORTOLOTTI, J. W., BONFANTI-AZZOLIN, G., & PARISI, M. M. Efeito citotóxico diferencial do extrato hidroetanólico de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre eritrócitos e células mononucleares de sangue periférico. *Holos*, 1, 1–16, 2021. <https://doi.org/10.15628/holos.2021.10257>

MORRIS, V. J.; BELSHAW, N. J.; WALDRON, K. W.; MAXWELL, E. G. The bioactivity of modified pectin fragments. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 1. v. 1, n. 1, p. 21-37, 2013.

MÜLLER-MAATSCH, J. et al. Simple and Validated Quantitative ¹H NMR Method for the Determination of Methylation, Acetylation, and Feruloylation Degree of Pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014.

NAGGAR, V. F. et al. Pectin, a possible matrix for oral sustained-release preparations of water-soluble drugs. *Pharma Sciences*, v. 2, n. 3, p. 227–234, 1992.

NAQASH, F. et al. Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin— A Review. *Carbohydrate Polymers*, v. 168, p. 227–239, 2017.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Drugs Approved for Melanoma. 19 jan. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/melanoma>. Acesso em: 21 de maio de 2023.

Perrone P, Hewage CM, Thomson AR, Bailey K, Sadler IH, Fry SC. Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity. *Phytochemistry*. 2002 May;60(1):67-77. doi: 10.1016/s0031-9422(02)00039-0. PMID: 11985854.

POSTOW, M. A.; SIDLOW, R.; HELLMANN, M. D. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *New England Journal of Medicine*, v. 378, n. 2, p. 158–168, 2018.

PRADO et al. Migration and proliferation of cancer cells in culture are differentially affected size of modified citrus pectin. *Carbohydr Polym.*, v. 211, p. 141-151, 2019.

RIBEIRO, C. G. ATIVIDADE ANTIMELANOMA IN VITRO DA PECTINA DO MARACUJÁ DESESTERIFICADA QUIMICAMENTE. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, v.1, n. 364 – 369, 2001.

RUFINO, M. S. M. ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PERÉZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Comunicado técnico: Embrapa, 125, ISSN 1679-6535, 2006.

SHOEMAKER, J. A. Small fruit cultura. Westport Conn: AVI-Bramble fruits, 188-250, 1978.

SILVA, M. L.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B.; Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semana: Ciências Agrárias, Londrina*, V. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, D. C. et al. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 1, p. 139–145, 2012.

SPADACIO, C., BARROS, N., Uso de medicinas alternativas e complementares por pacientes com câncer: revisão sistemática. *Revista de Saúde Pública*, 2008.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SUNGTHONGJEEN, S. et al. Studies on Pectins as Potential Hydrogel Matrices for Controlled-Release Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 25, n. 12, p. 1271–1276, 1999.

TABOADA, EDELIO & FISHER, PATRICIO & JARA, RORY & ZÚÑIGA, ELISA & GIDEKEL, MANUEL & CABRERA, JUAN CARLOS & PEREIRA, EDUARDO & GUTIÉRREZ-MORAGA, ANA & VILLALONGA, REYNALDO & CABRERA, GUSTAVO. 2010. Isolation and characterisation of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits. *Food Chemistry*. 123. 669-678, 2010.

TSALA, D. E.; AMADOU, D.; HABTEMARIAM, S. Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology*, v. 4, n. 3, p. 532–560, 2013.

VICTORIA V. GOLOVCHENKO, VICTOR A. KHLOPIN, OLGA A. PATOVA, LIUBOV S. FELTSINGER, MARIA I. BILAN, ANDREY S. DMITRENOK, ALEXANDER S. SHASHKOV, 2022. Pectin from leaves of birch (*Betula pendula* Roth.): Results of NMR experiments and hypothesis of the RG-I structure, *Carbohydrate Polymers*, Volume 284, 2022.

WANG, S. Y.; MAAS, J. L.; PAYNE, J. A.; GALLETTA, G. J. Ellagic acid content in small fruits mayhaws, and other plants. *Jour. of Small Fruit and Viticulture*, Baton Rouge, v. 2, n. 4, p. 11-49, 1994.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 140-146, 2000.

WINDER, M.; VIRÓS, A. Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 249, p. 91-108, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 20 de maio de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer tomorrow, 2021. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=1&single_unit=5000&sexse=2&populations=76&group_populations=1&multiple_populations=1. Acesso em: 20 de maio de 2023.

WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters*, v. 387, p. 61–68, 2017.

XU, H.; XU, X. Polysaccharide, a Potencial Anti-cancer Drug with High Efficacy and Safety. *Journal of Oncology Reseach and Treatments*, v. 1, n. 2, p. 1-2, 2016.

ZAITSEVA, O. et al. Pectins as a universal medicine. *Fitoterapia*, v. 146, n. March, p. 104676, 2020.

ZHANG, M. et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, v. 18, n. 1, p. 4–19, 2007.

ZHANG, W.; XU, P.; ZHANG, H. Pectin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 44, n. 2, p. 258–271, 2015.