

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
PPGBIOTEC

Dissertação

**Avaliação do potencial  
biotecnológico de derivados  
sintéticos de eugenol para o  
tratamento de Glioblastoma**

*Andreia da Silva Dias*

Ouro Preto  
2023



ANDREIA DA SILVA DIAS

**Avaliação do potencial biotecnológico de derivados sintéticos de eugenol para o tratamento de Glioblastoma**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal..

**Orientador:** Prof. Dr. Laser Antônio Machado Oliveira

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Katiane de Oliveira Pinto  
Coelho Nogueira

OURO PRETO-MG

2023

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

D541a Dias, Andreia da Silva.

Avaliação do potencial biotecnológico de derivados sintéticos de Eugenol para o tratamento de Glioblastoma. [manuscrito] / Andreia da Silva Dias. - 2023.

72 f.: il.: color., gráf..

Orientador: Prof. Dr. Laser Antônio Machado Oliveira.

Coorientadora: Profa. Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Câncer. 2. Glioblastoma. 3. Derivados sintéticos. 4. Eugenol. 5. Fármacos. I. Oliveira, Laser Antônio Machado. II. Nogueira, Katiane de Oliveira Pinto Coelho. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 606:628

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Andreia da Silva Dias**

### **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Derivados Sintéticos de Eugenol para o Tratamento de Glioblastoma**

Dissertação apresentada ao Programa de Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

Aprovada em 21 de Junho de 2023

#### Membros da banca

Doutor Laser Antônio Machado Oliveira - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Doutora Cíntia Lopes de Brito - (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Doutora Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla - (Universidade Federal do Espírito Santo)

Laser Antônio Machado Oliveira, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 28/09/2023



Documento assinado eletronicamente por **Laser Antonio Machado Oliveira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 28/09/2023, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0596791** e o código CRC **E866874A**.

Dedico este trabalho à minha  
família, por todo apoio e amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças e me guiado ao trilhar este caminho em busca do meu crescimento pessoal/profissional e a concretização de mais este sonho.

Aos meus pais, Joventino e Cláudia, que sempre vibraram pelas minhas conquistas. Agradeço por todo apoio, amor e orações. Sou eternamente grata por tudo que fizeram por mim.

À Geovana, por sempre estar ao meu lado e mesmo não fazendo parte da comunidade acadêmica, me auxiliou com o que eu precisava. Palavras não suficientes para te agradecer. Conte sempre comigo, irmã!

Ao Eleandro, por todo companheirismo, amor, paciência, apoio nos momentos difíceis e por sempre estar ao meu lado. Seu apoio foi fundamental e essencial para que eu pudesse completar este ciclo do mestrado. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Laser Machado, pela orientação na realização deste trabalho e, principalmente, pela oportunidade de compartilhar do seu conhecimento. Agradeço à compreensão, ao incentivo, preocupação, paciência e presença durante todo o mestrado.

À Prof<sup>a</sup>. Katiane Nogueira pela coorientação e disponibilidade em ensinar.

Às colegas de graduação, nosso grupo de “capivaras”. Foram muitas risadas e companheirismo durante este período e, estar com vocês tornou tudo mais leve e descontraído.

À Lutécia, presente que a graduação me deu! Obrigada por sempre estar comigo em todos os momentos na graduação, desde os apertos para estudar para as provas, até os momentos alegres como fazer o intercâmbio juntas. Te desejo sucesso sempre!

Aos colegas do LNBio pelas discussões, momentos de descontração e trocas vividas durante a execução da minha pesquisa. E, à Ramony por todo auxílio durante a realização dos experimentos.

Ao LBTM pela disponibilização de equipamentos importantes para a realização desta pesquisa.

Ao Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos, coordenado pelo Prof. Dr. Róbson Teixeira (UFV) pela disponibilização dos derivados de eugenol.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na execução deste trabalho, a minha eterna gratidão.

**Obrigada!**

## RESUMO

Atualmente o câncer é uma das doenças que mais matam no mundo, mesmo com todo o avanço nos métodos de diagnósticos e nos procedimentos quimioterápicos. Associado às mutações que acontecem frequentemente no genoma das células cancerígenas, novos métodos de tratamento frequentemente não obtêm êxito. Com isso, as neoplasias são difíceis de se tratar e em muitas situações os tratamentos não curam essa enfermidade por completo. Dentre as neoplasias que podem acometer o sistema nervoso central encontramos os gliomas, tumores com origem a partir das células da glia. O tipo mais comum de glioma é o glioblastoma (GBM). Especificamente nesta doença, ainda que a ressecção tumoral apresente o melhor resultado possível, onde todo o tumor foi removido, existem células infiltrativas que escapam do procedimento cirúrgico, levando a uma recidiva da doença. Adjuvante à ressecção, o tratamento segue com a quimio e radioterapia, visando apenas a sobrevida que ainda é curta. A maioria dos pacientes diagnosticados com esta neoplasia não sobrevivem por mais do que 15 meses a partir do diagnóstico. Com base nesses resultados não esperançosos dos tratamentos comumente utilizados para o GBM e também pela característica difusa desse tumor, estudos acerca de novos procedimentos terapêuticos devem ser realizados. É sabido que os compostos naturais podem exibir atividade inibindo o crescimento de células cancerígenas, atuar no controle de certas vias de expressão gênica que estão ligadas à atividade tumoral, assim como também apresentar efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anti metastáticos. Um grande exemplo de produto natural que apresenta as atividades citadas é o eugenol. Por isso, esses compostos, e também outros fármacos obtidos a partir deles, representam um vasto campo de possibilidades para a obtenção de procedimentos terapêuticos seguros e eficazes. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de derivados do eugenol como possíveis candidatos a fármacos para o tratamento do glioblastoma. Para isto, utilizamos a linhagem U87MG e realizamos os ensaios *in vitro* de metabolismo celular (MTT) para triar e selecionar o composto com melhor atividade, migração por meio do ensaio de cicatrização de feridas, proliferação e formação de colônias. Com base nestes experimentos foi possível observar um efeito anti-tumoral do derivado 5V, inibindo todos os parâmetros analisados. Assim, este derivado se mostrou como um candidato promissor para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento do glioblastoma.

**Palavras-chaves:** Câncer, glioblastoma, derivados sintéticos; eugenol, desenvolvimento de fármacos

## ABSTRACT

Currently, cancer is one of the most deadly diseases in the world, even with all the advances in diagnostic methods and chemotherapy procedures. Associated with mutations that frequently occur in the genome of cells, new treatment methods are often unsuccessful. Thereby, neoplasms are difficult to treat and in many situations treatments do not completely cure this disease. Among the neoplasms that can affect the central nervous system, we find gliomas, tumors originating from glial cells. The most common type of glioma is glioblastoma (GBM). Specifically in this disease, although tumor resection presents the best possible result, where the entire tumor has been removed, there are infiltrative cells that escape the surgical procedure, leading to disease recurrence. As an adjunct to resection, treatment continues with chemo and radiotherapy, aiming only at survival, which is still short. Most patients diagnosed with this neoplasm do not survive more than 15 months from diagnosis. Based on these hopeless results of commonly used treatments for GBM and also due to the diffuse nature of this tumor, studies about new therapeutic procedures should be carried out. It is known that natural compounds can exhibit activity by inhibiting the growth of cancer cells, acting in the control of certain gene expression pathways that are linked to tumor activity, as well as exhibiting antioxidant, anti-inflammatory and anti-metastatic effects. A great example of a natural product that has the aforementioned activities is eugenol. Therefore, these compounds, as well as other drugs obtained from them, represent a vast field of possibilities for obtaining safe and effective therapeutic procedures. Thus, the present study aimed to evaluate the biotechnological potential of eugenol derivatives as possible drug candidates for the treatment of glioblastoma. For that, we used the U87MG lineage and performed in vitro cell metabolism assays (MTT) to screen and select the compound with the best activity, migration through the wound healing assay, proliferation and colony formation. Based on these experiments, it was possible to observe an anti-tumor effect of the 5V derivative, inhibiting all analyzed parameters. Thus, this derivative proved to be a promising candidate for the development of a new drug for the treatment of glioblastoma.

**Keywords:** Cancer, glioblastoma, synthetic derivatives; eugenol, drug development

## **FINANCIAMENTO**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia e Biomateriais (LNBio) do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Carcinogênese.....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b> Células do Sistema Nervoso Central.....	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b> Células Tronco Neurais geram neurônios, astrócitos, e as células precursoras de oligodendrócitos .....	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do eugenol .....	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Mecanismos moleculares antitumorais do eugenol.....	<b>26</b>
<b>Figura 6.</b> Estrutura do 1,2,3 triazol .....	<b>27</b>
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do ensaio de migração celular.....	<b>36</b>
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do ensaio de proliferação celular.....	<b>37</b>
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do ensaio de formação de colônia.....	<b>38</b>
<b>Figura 10.</b> Avaliação do metabolismo celular por MTT em células da linhagem U87MG após o tratamento com o eugenol e os derivados <b>5V</b> , <b>5Y</b> e <b>5Z</b> .....	<b>41</b>
<b>Figura 11.</b> Avaliação do metabolismo celular por MTT em células da linhagem 3T3 e J774 após o tratamento com o derivado <b>5V</b> .....	<b>43</b>
<b>Figura 12.</b> Efeito do derivado 5V na migração celular em células U87MG.....	<b>44</b>
<b>Figura 13.</b> Avaliação da proliferação de células U87MG após o tratamento com o composto 5V.....	<b>45</b>
<b>Figura 14.</b> Efeito do derivado 5V na formação de colônias em células U87MG, após tratamento de 7 dias nas concentrações estudadas.....	<b>47</b>

## LISTA DE ABREVIações

**%** - Porcentagem

**°C** - Graus celsius

**3T3** - Linhagem de fibroblasto murino

**µl** - Microlitros

**µg** - Microgramas

**µM** - Micromolar

**U/mL** - Unidades por mililitros

**v/v** - Volume por volume

**nm** - Nanômetros

**A2058** - Linhagem de melanoma

**A549** - Linhagem de carcinoma pulmonar

**ATCC** - American Type Culture Collection

**C6** - Linhagem de glioma de rato

**Caco-2** - Linhagem de adenocarcinoma colorretal humano

**CO<sub>2</sub>** - Gás carbônico

**DBTRG-05MG** - Linhagem de glioblastoma humano

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DU-145** - Linhagem de células de câncer de próstata insensíveis a andrógenos

**EROs** - Espécies reativas de oxigênio

**FDA** - Food and Drug Administration

**GBM** - Glioblastoma

**Gy** - Grays

**HB8065** - Linhagem de carcinoma hepatocelular

**HeLa** - Linhagem de câncer cervical

**HOS** - Linhagem de osteossarcoma

**HT-29** - Linhagem de adenocarcinoma colorretal humano

**IC50** - Concentração inibitória média

**IDH** - Isocitrato Desidrogenase

**INCA** - Instituto nacional do câncer

**J774** - Linhagem de macrófago murino  
**KB** - Linhagem de células de carcinoma escamoso oral  
**Kg** - Quilograma  
**LBTM** - Laboratório de biotecnologia e microorganismos  
**LNBio** - Laboratório de neurobiologia e biomateriais  
**mg** - Miligramas  
**mL** - Mililitros  
**mM** - Milimolar  
**MCF-7** - Linhagem de câncer de mama  
**MDA MB-231** - Linhagem de câncer de mama  
**MMP-9** - Matrix metalloproteinase 9  
**MTT** - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio  
**MCF10A-ras** - Linhagem de células epiteliais de mama humana transfectadas com o oncogene H-ras  
**NF-  $\kappa$ B** - Fator Nuclear- kappa B  
**NSCs** - Células Tronco Neurais  
**NUPEB** - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas  
**OMS** - Organização mundial da saúde  
**OPCs** - Células Precursoras de Oligodendrócitos  
**SFB** - Soro fetal bovino  
**SD** - Desvio padrão  
**SIHA** - Linhagem de câncer de colo do útero  
**SHG-44** - Linhagem de Glioma humano  
**SK-Mel-28** - Linhagem de melanoma  
**SNC** - Sistema nervoso central  
**SW-620** - Linhagem de adenocarcinoma colorretal humano  
**TMZ** - Temozolomida  
**U87MG** - Linhagem de Glioblastoma humano  
**U251** - Linhagem de Glioblastoma humano  
**U118** - Linhagem de Glioblastoma humano  
**UFOP** - Universidade Federal de Ouro Preto  
**UFV** - Universidade Federal de Viçosa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1. CÂNCER.....	15
1.2. TUMORES DO SNC.....	17
1.3. GLIOBLASTOMA.....	19
1.4. COMPOSTOS NATURAIS.....	23
1.5. EUGENOL.....	24
1.6. NÚCLEO 1,2,3 TRIAZOL.....	27
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
3.1. CULTIVO CELULAR.....	32
3.2. OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS.....	32
3.3. ENSAIO DE METABOLISMO CELULAR.....	33
3.4. ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDA.....	35
3.5. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	36
3.6. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA.....	37
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1. ENSAIO DE METABOLISMO CELULAR.....	40
4.2. ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....	43
4.3. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	45
4.5. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA.....	46
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>56</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

# Introdução

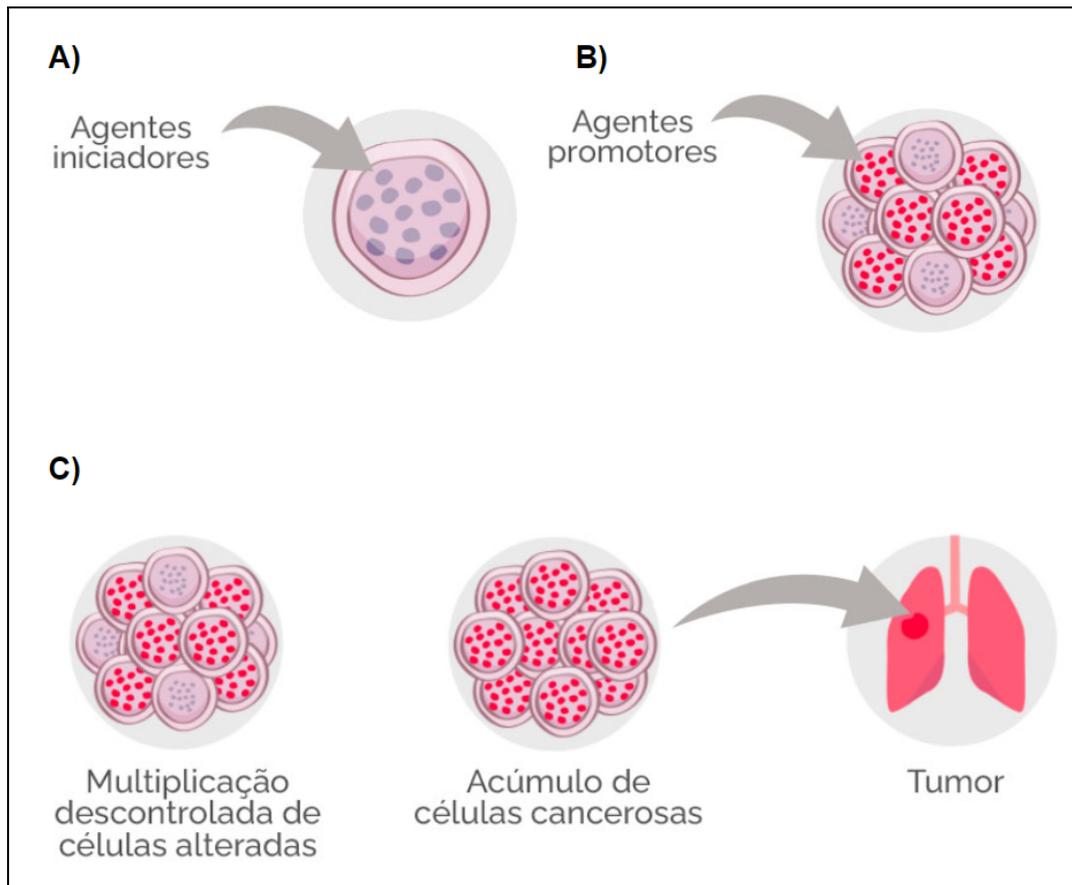
---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CÂNCER

O termo câncer é utilizado para representar um grande número de doenças que podem afetar qualquer sistema caracterizado pela rápida expansão de células defeituosas, podendo estas migrarem para regiões distantes de onde iniciou-se o tumor (Zari et al., 2021). A formação de células aberrantes pode ser devido a fatores químicos, físicos ou biológicos (Zakiryanova et al., 2018). A ativação dos oncogenes assim como a inativação de genes supressores de tumor são responsáveis pelo desenvolvimento tumoral, processo que promove o descontrole do ciclo celular (Dodurga et al., 2018; Xiao et al., 2022). Todas essas alterações fazem com que a célula adquira novas capacidades como proliferação descontrolada, imortalidade replicativa e invasão de outros tecidos, processo conhecido como metástase, sendo esta a principal causa de mortalidade das doenças cancerígenas (Abu-Helil & Van Der Weyden, 2019; Benisty et al., 2020; Kontomanolis et al., 2020).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese (**Fig.1**), onde a célula normal é modificada em célula tumoral num processo lento, no qual os genes responsáveis pelos mecanismos de regulação da proliferação, crescimento e diferenciação celular vão sofrendo mutações repetidamente resultando em uma proliferação desordenada das células (Almeida et al., 2005; Caponero, 2008). Esse processo pode ser dividido em três estágios diferentes, chamados: **1)** Estágio de iniciação - onde há exposição das células normais a algum agente cancerígeno, fazendo com que ocorra alguma alteração do DNA dessas células; **2)** Estágio de promoção - onde as células, já com seu material genético alterado, sofrem agora a ação de agentes oncopromotores, os quais transformarão essas células em malignas, num processo lento e contínuo; **3)** E por último o estágio de progressão, que corresponde à proliferação descontrolada característica da célula cancerígena, e o aparecimento de manifestações clínicas. Nesse último estágio essas células podem invadir novos tecidos e órgãos, causando a perda parcial ou total da função do órgão invadido (Abu-Helil & Van Der Weyden, 2019; Li et al., 2019; INCA, 2022).



**Fig 1.** Carcinogênese. A) Iniciação B) Promoção C) Progressão (INCA, 2022)

De acordo com a Organização mundial da saúde (OMS)(2018), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, representando assim uma das principais causas de morbidade e mortalidade mundial, sendo considerado uma das principais barreiras para o aumento da expectativa de vida global (Fidler et al., 2018; Bray et al., 2021; Zari et al., 2021). Dados estatísticos revelam que uma em cada oito mortes no mundo ocorrem devido ao câncer, e que a cada ano são descobertos nove milhões de novos casos da doença. Além disso, estimativas apontam que em 2030 as doenças cancerígenas estarão em número um no ranking das causas de mortes globais, e que por ano aproximadamente dez milhões de pessoas morrem por conta dessas enfermidades (Karavasiloglou et al., 2022; Salari et al., 2022). Estudos apontam uma correlação positiva entre o aumento da expectativa de vida e o número de incidência de câncer, fato que corrobora com as estatísticas que preveem aumento do número de casos da doença nas próximas

décadas, elevando assim os custos com a saúde pública (Fidler et al., 2018; Miraghajani et al., 2018).

Atualmente, a falta de cuidado com a saúde, hábitos de vida não saudáveis, juntamente com o uso abusivo de pesticidas e agrotóxicos, além do aumento da expectativa de vida, são fatores críticos para aumento do número de casos de câncer (Begum et al., 2022). No entanto, de acordo com a OMS, em países onde há um sistema de saúde melhor preparado, o número de pacientes com cânceres que sobrevivem à doença estão aumentando, isso devido ao fato do tratamento nas fases iniciais da doença ser mais acessível e de qualidade. Os tratamentos disponíveis para o câncer envolvem processos cirúrgicos para retirar a maior quantidade possível de massa tumoral (ressecção tumoral), assim como a quimio e radioterapia, para diminuir o tamanho do tumor e/ou combater possíveis células remanescentes após a ressecção (Nalli et al., 2021; Begum et al., 2022; Lau et al., 2022).

## 1.2. TUMORES DO SNC

O sistema nervoso, apesar de todas suas características peculiares, pode ser acometido por tumores de várias naturezas. Neoplasias nesse sistema contabilizam cerca de 1% das demais no corpo humano. Essas podem ser primárias ou secundárias - conhecidas como metastáticas, benignas ou malignas, e intra-axiais ou extra-axiais. Estes tumores são atípicos quando comparados com as demais partes do corpo, assim como também com outras enfermidades que afetam o tempo de vida de uma pessoa e podem atingir adultos e crianças. (Alomar, 2010; Thanka et al., 2021)

O sistema nervoso central (SNC) é dividido anatomicamente no encéfalo e a medula espinhal. Nele podemos identificar dois grupos celulares, os neurônios - também conhecidos como células nervosas, que possuem a função de receber, armazenar e transmitir informações, além das células da neuroglia ou simplesmente células da glia, que estão intimamente associados aos neurônios e dando suporte a eles. São conhecidos quatro tipos de células da glia no SNC: os astrócitos, células endimárias, oligodendrócitos, e a micróglia (**Fig. 2**) (Thanka et al., 2021).

Existe uma grande diversidade de tumores do sistema nervoso central compreendendo diferentes histologias, aspectos clínicos, intervenções e desfechos.

Apesar de serem infrequentes, estes tumores possuem uma alta taxa de mortalidade resultando em uma pequena quantidade de indivíduos que sobrevivem num período de 5 anos após receberem o diagnóstico (Alomar, 2010; Ruano-Ravina et al., 2019; Miller et al., 2021).

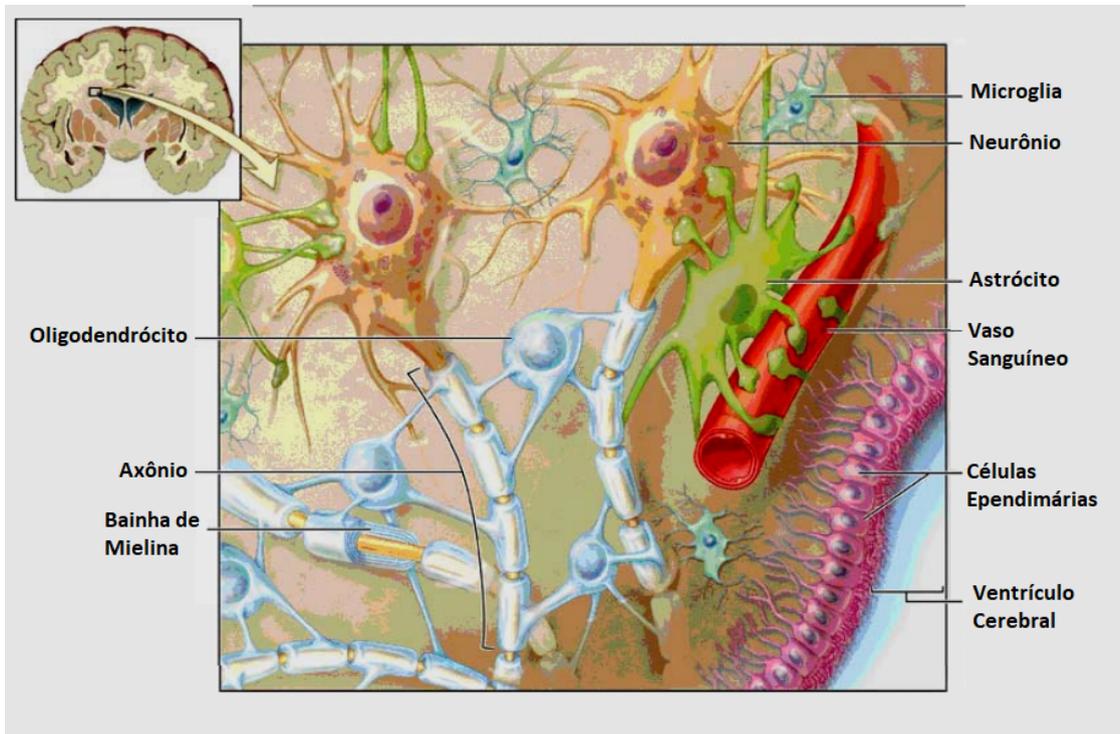


Fig 2. Células do SNC (Tramontina, 2008).

O SNC encontra-se alocado dentro da caixa craniana, a qual não é extensível (com a exceção dos neonatos e crianças pequenas), com isso, quaisquer novos acréscimos só podem acontecer em detrimento das estruturas já presentes dentro do crânio e da coluna vertebral. A sintomatologia desses tumores varia de acordo com a localização deles no SNC, assim como também o índice de crescimento da neoplasia. Os sintomas podem consistir em sinais e sintomas focais, que se referem ao efeito do tumor em estruturas específicas, e também em sinais e sintomas gerais; aumento da pressão intracraniana, sonolência, confusão, cefaleia, náuseas, vômitos, papiledema, convulsões e comprometimento cognitivo. A tomografia computadorizada e ressonância magnética são as técnicas com base na produção de imagens que são de total importância para a localização desses tumores e posterior realização de biópsias (Alomar, 2010; Gómez-Vega et al., 2019).

Durante anos, os cânceres no SNC se perpetuaram como sendo alguns dos casos clínicos mais intratáveis da farmacologia. Os tumores malignos nas regiões do encéfalo e medula espinhal são de tratamento complicado devido à dificuldade na entrega e resistência à ação dos fármacos, assim como também pelo fato de danos aos tecidos adjacentes serem graves para o paciente. Dado a escassez desses tumores, há uma carência em padrões de tratamento para grande parte deles. (Schor, 2009; Franceschi et al., 2020).

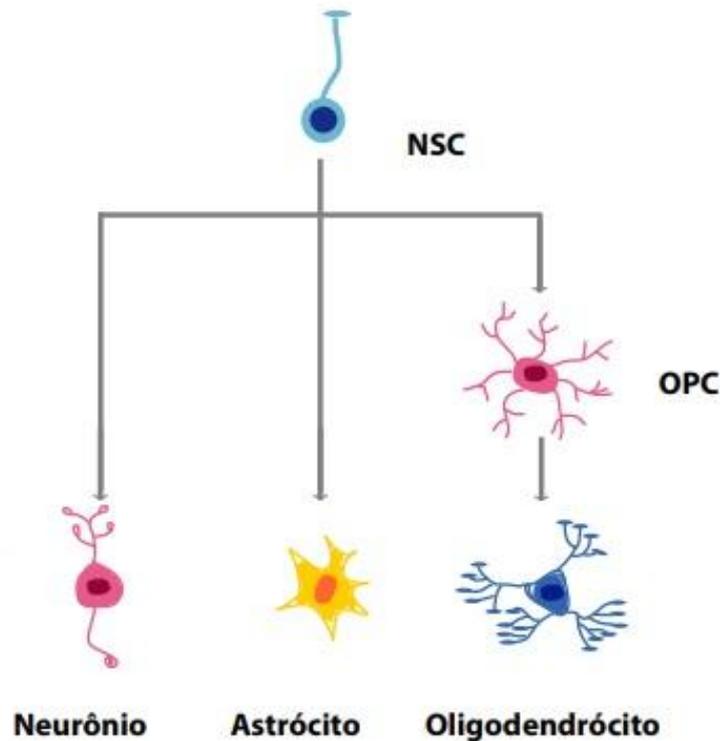
### 1.3. GLIOBLASTOMA

Os gliomas cerebrais são um conjunto de tumores no Sistema Nervoso Central, que acometem as células de glia. A ocorrência por ano de gliomas é baixa, sendo de aproximadamente seis casos a cada 100.000 indivíduos em todo o mundo (Weller et al., 2021).

Podem resultar numa grande variedade de tumores que segundo a sua periculosidade são classificados em graus (I, II, III e IV) (Pla et al., 2021). Estudos anteriores subdividiam os gliomas em ependimomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitoma e astrocitomas, no entanto, de acordo com a revisão da OMS de 2016, os gliomas não são mais classificados somente pelas suas respectivas células formadoras/ características histopatológicas, e sim, também de acordo com aspectos genético-moleculares (Louis et al., 2016; Villa, et al., 2018; Pereira et al., 2019).

Dentre os gliomas, o glioblastoma (GBM) é o subtipo mais frequente, possuindo a mais alta classificação de tumores, sendo considerado como grau IV (Wirsching & Weller, 2017; Ohgaki & Kleihues, 2007). De acordo com aspectos moleculares, pode-se afirmar que o GBM origina-se a partir de células tronco neurais (NSCs), astrócitos originários dessas NSCs e de células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) (**Fig. 3**) (Yao et al., 2018; Clancy et al., 2021; Wu et al., 2021). Pode ser subdivididos de acordo com a mutação no gene IDH da enzima Isocitrato Desidrogenase em IDH mutante, IDH selvagem e NOS (onde não é possível analisar a mutação IDH) (Louis et al., 2016; Tan et al., 2020; Weller et al., 2021). Já considerando os aspectos histológicos, os subtipos são classificados como neoplasias astrocíticas, pois não é possível diferenciá-los apenas com este

parâmetro (Aldape et al., 2015; Romani et al., 2018; Maghe et al., 2020). De acordo com sua apresentação clínica, o GBM pode ser definido em dois subtipos; um glioblastoma primário que se manifesta sem uma evidência de lesão menos maligna já existente, ou o glioblastoma secundário que se desenvolve a partir de um glioma existente de grau 2 ou 3, processo que leva vários anos para acontecer (Marumoto & Saya, 2012).



**Fig 3.** Células Tronco Neurais (NSCs) podem gerar neurônios, astrócitos, e as células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) que originarão os oligodendrócitos maduros. Adaptado de Ledur, 2015.

O glioblastoma apresenta uma baixa incidência anual levando em consideração outros cânceres, como por exemplo o de mama e o de próstata (Wirsching & Weller, 2017). Dado a sua classificação, é um dos tumores mais difíceis de serem tratados por causa da sua agressividade, sendo o tumor mais prevalente e letal dentre os gliomas, representando cerca de 57% deles e 48% dos tumores malignos primários do SNC. O GBM leva a 4% de todas as mortes por tumores, com uma sobrevida média de aproximadamente 15 meses, e apenas 2% dos casos sobrevivem por até 5 anos (Holland, 2000; Romani et al., 2018; Ostrom et al., 2019; Singh et al., 2021; Al-Holou et al., 2023). Além disso, dados estatísticos revelam que a incidência do GBM aumenta com a idade, sendo que o índice de sua

sobrevivência é inversamente proporcional à idade (Wirsching & Weller, 2017; Wu et al., 2021). Com o aumento da expectativa de vida mundial, espera-se que o número de casos de glioblastoma também aumente, dado o maior número de idosos. Dessa forma, é de suma importância que ocorram avanços nos tratamentos desses tumores, melhorando os padrões de cuidados para esses pacientes (De Moraes & Laperriere, 2017).

O GBM é geralmente encontrado nos hemisférios cerebrais, sendo que as regiões mais afetadas são o lobo temporal, parietal e frontal, sendo que o glioblastoma do tronco cerebral e do cerebelo é mais comum em crianças e raro em adultos (Stark et al., 2010). A sintomatologia varia de acordo com o local que o tumor está localizado, mas de modo geral, os sintomas vão de dores de cabeça, déficits neurológicos focais, confusão mental, até sintomas como alterações de personalidade, problemas de memória e convulsões (Netto et al., 2019).

Os GBMs são heterogêneos no conjunto de células que os compõem, seja de um mesmo paciente (intratumoral) ou até mesmo entre diferentes pacientes (intertumoral). Segundo suas características histológicas, o glioblastoma é um tumor neuroglial com variação de forma e tamanho das células e seus núcleos, aparência anormal e irregular dos núcleos celulares, hiper celularidade, rápido crescimento e divisão das células, proliferação microvascular e necrose (Stark et al., 2010; De Moraes & Laperriere, 2017; Lebel et al., 2021).

O prognóstico dos pacientes diagnosticados com esta doença é ruim, e a medida que a evolução da doença ocorre a qualidade de vida se deteriora, sendo que a maioria dos pacientes morrem em aproximadamente 3 meses após o diagnóstico, se não tratados (Ohgaki & Kleihues, 2007; Netto et al., 2019; Clancy et al., 2021). Ainda que tratados, estes pacientes não sobrevivem por muito tempo. Assim, dado ao fato da baixa expectativa de vida após a descoberta da doença e não terem praticamente uma sobrevida longa, esses tumores têm chamado atenção (Holland, 2000).

Mesmo que avanços nos tratamentos de GBMs tenham sido observados, os resultados vistos não são encorajadores, já que ainda não existe cura para esse tipo de tumor. Os tratamentos utilizados até o momento buscam apenas dar uma sobrevida com uma qualidade de vida melhor ao paciente, sendo que o tratamento padrão é a ressecção tumoral juntamente com a quimio e radioterapia (Alexander & Cloughesy, 2017). Todavia, mesmo após tais procedimentos, grande parte dos

pacientes têm a doença recorrente em aproximadamente 6 meses, sendo que nestes casos de recidiva, não há um tratamento padrão utilizado pelas equipes médicas. Entretanto, a quimioterapia alquilante é comumente empregada nessa situação (Tan et al., 2020).

A primeira etapa do tratamento do glioblastoma é a cirurgia, desempenhando um importante papel no tratamento desses tumores. O objetivo da ressecção tumoral é extrair o máximo possível do tumor, sem que haja maiores danos aos tecidos circunvizinhos, ou seja, sem comprometer a função neurológica, e quanto maior o grau da ressecção, maior a sobrevida do paciente posteriormente (Tan et al., 2020; Pla et al., 2021). No entanto, dada a característica invasiva do tumor e o risco de morbidade significativa, a ressecção radical da massa tumoral primária não leva a cura e, mesmo retirando as células tumorais visíveis, tanto quanto for possível, ainda sim permanecem células remanescentes infiltradas nos tecidos circunvizinhos, levando à reincidência da doença posteriormente (Wilson et al., 2014; Davis, 2016).

Após a ressecção cirúrgica, a radio e a quimioterapia entram em ação. Na radioterapia é recomendado o uso de cerca de 60 Gy de radiação para realizar radioterapia conformacional na área da lesão por um período de seis semanas (Tan et al., 2020; Gilard et al., 2021). Já para a quimioterapia, é sabido que o tratamento quimioterápico tem um papel reduzido no tratamento do glioblastoma. Tal limitação ocorre em grande parte devido a barreira hematoencefálica, que delimita a entrada de fármacos no cérebro, reduzindo assim o seu efeito. O agente de quimioterapia mais utilizado para o GBM é a temozolomida (TMZ), um agente alquilante de DNA, utilizado via oral, que dado às suas características lipofílicas consegue passar pela barreira hematoencefálica (Najman & Gadelha, 2002; Davis, 2016; Campos-Sandoval et al., 2021). No entanto, foi observado que cerca de 50% das pessoas com casos de glioblastoma não respondem a TMZ, ocorrendo resistência ao medicamento e efeitos colaterais graves (Campos-Sandoval et al., 2021).

Até o presente momento, não existe um protocolo de terapia eficaz contra o GBM, um dos tumores mais desafiadores existentes, sendo claro a extrema importância de estratégias terapêuticas aprimoradas e eficientes. Os estudos de compostos naturais podem representar uma alternativa de solução mais eficaz e que não apresente os efeitos colaterais e resistência que estão presentes nos

protocolos de tratamentos atuais de GBMs (Campos-Sandoval et al., 2021; Turkez et al., 2021).

#### 1.4. COMPOSTOS NATURAIS

A humanidade utiliza muitos recursos oferecidos pela natureza há milhares de anos para combater uma gama de enfermidades. Os produtos naturais podem ser extraídos de diferentes fontes, como animais, microrganismos, plantas e organismos marinhos. Dado à evolução, estas moléculas são diversas, fornecendo estruturas químicas variadas que podem demonstrar um bom potencial terapêutico, como uma boa absorção na forma farmacêutica, e maior equilíbrio ao interagir com os constituintes ativos, demonstrando assim o potencial de serem utilizadas na descoberta de novas drogas. Porém, alguns dos produtos naturais encontram dificuldades de serem utilizados de forma direta na clínica e por serem boas inspirações para a síntese de análogos, são feitas modificações nessas moléculas com o objetivo de se obter medicamentos viáveis e eficazes (Barreiro & Bolzani, 2009; Pan et al., 2010; Lahlou, 2013; Guo, 2017; Park et al., 2017; Majhi & Das, 2021).

Hoje em dia, a importância e magnitude dos produtos naturais como fonte de fármacos é confirmada através do significativo número de medicamentos disponíveis no mercado, advindos de fontes naturais ou inspirados neles. No período de 1981 a 2019, dos 1881 novos fármacos aprovados, cerca de 3,8% (71) são provenientes direto de fontes naturais, 0,8% (14) advêm das drogas botânicas, 18,9% (356) são derivados de produtos naturais, 22,5% (424) mimetizam os produtos naturais e 27,8% (528) são sintéticos (Newmann & Cragg, 2020). Assim, vemos a importância dos produtos naturais como fonte e inspiração de novos fármacos. Exemplos de medicamentos advindos de fontes naturais podem ser facilmente observados como o taxol (*Taxus brevifolia*), artemisinina (*Artemisia annua*), morfina (*Papaver somniferum*) e penicilina (*Penicillium* sp).

No contexto do câncer, os produtos naturais devido a sua menor toxicidade e tolerância em concentrações mais altas, por exemplo, são uma boa alternativa para tentar driblar os efeitos indesejados que a quimioterapia apresenta atualmente. Muitos fitoquímicos são descritos pela comunidade científica com propriedades

antineoplásicas e demonstram ser bons candidatos para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do câncer (Lagoa et al., 2020; Padhy et al., 2022). A exemplo de fármacos utilizados para o tratamento antitumoral derivados a partir de fontes naturais temos a Vincristina e a Vinblastina que são encontradas na *Catharanthus roseus*, e representam uma classe de alcalóides utilizados por mais de 40 anos no tratamento do câncer. (Souza et al., 2007)

Atualmente, cerca de metade dos medicamentos disponíveis contra o câncer, possuem a substância que exerce efeito farmacológico (princípios ativos), advinda de fontes naturais ou então são derivados semi-sintéticos. (Souza et al., 2007; Sznarkowska et al., 2017). Entre janeiro de 1991 e dezembro de 2014, de todas as 136 drogas registradas que atuavam na luta contra o câncer, cerca de 113 (83%) eram naturais ou sintetizadas a partir de compostos naturais (Silva, 2017).

Apesar do uso extenso de compostos naturais na produção de fármacos, grande parte desses recursos ainda não foram explorados para esta finalidade pela indústria farmacêutica. Através desses dados, fica claro a importância dos estudos e testes de novas fontes naturais como oportunidade de se descobrir novos fármacos para o combate das neoplasias, levando ao desenvolvimento de protocolo terapêutico a partir de compostos não explorados (Aung et al., 2017; Chinembiri et al., 2014).

### 1.5. EUGENOL

O Eugenol (**Fig.4**) é um composto fenólico encontrado em diversas plantas tais como, cravo, soja, feijão, café, banana, e também em ervas, como; nós-moscada, manjerição, canela, sendo que o cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) pode ser considerado a principal fonte deste composto (Bezerra et al., 2017; Padhy et al., 2022).

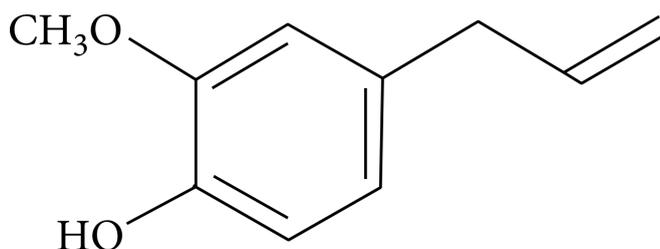


Fig 4. Estrutura química do eugenol. Nisar et al., 2021.

O eugenol tem sido aplicado em diferentes áreas, como na indústria de alimentos, medicina, perfumaria, cosméticos, aromatizantes e farmacêutica (Zari et al., 2021; Padhy et al., 2022). É classificado como “geralmente considerado seguro” para a administração oral, de acordo com a Food and Drug Administration (FDA) (Rasul et al., 2022). Está presente na medicina tradicional chinesa devido a sua ação antibacteriana, antisséptica e analgésica (Liang et al., 2015). Possui diversas outras atividades farmacêuticas já descritas como: antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, anticonvulsivante, antioxidante, pró-oxidante, neuroprotetora, antimutagênicas e antitumoral. Há estudos também que comprovam que o eugenol é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica - um grande obstáculo para a ação de fármacos no sistema nervoso, onde ele foi capaz de demonstrar sua atividade neuroprotetora (Won et al., 1998; Kabuto et al., 2007; Yogalakshmi et al., 2010; Manikandan et al., 2010; Jaganathan & Supriyanto, 2012; Fangjun & Zhijia, 2018; Li et al., 2020; Zari et al., 2021).

Estudos relatam que o eugenol apresenta efeitos anticancerígenos em diversos tipos de câncer como cólon, fígado, próstata, mama, melanoma, pulmão, entre outros (Gosh et al., 2005; Carrasco et al., 2008; Gosh et al., 2009; Hussain et al., 2011; Al-Sharif et al., 2013; Abdullah et al., 2018; Fangjun & Zhijia, 2018; Zari et al., 2021; Nisar et al., 2021; Ulanowska & Olas, 2021; Petrocelli et al., 2021).

De acordo com a literatura, seu efeito antitumoral se dá por diferentes vias mecânicas (**Fig.5**), levando à apoptose, parada do ciclo celular, inibição da inflamação, angiogênese, invasão e metástase (Manikandan et al., 2010; Abdullah et al., 2018; Padhy et al., 2022; Begum et al., 2022). Além disso, estudos relatam o duplo efeito que o eugenol possui, atuando tanto como antioxidante (em baixas concentrações) e também como pró-oxidante (em concentrações mais altas) (Yoo et al., 2005; Bezerra et al., 2017; Gorrini et al., 2013).

As vias pelas quais o eugenol atua são dependentes do tipo de câncer, além da dose/tempo de tratamento (Padhy et al., 2022). Ademais, o eugenol, por ser um óleo, apresenta lipossolubilidade e hidrofobicidade. Tais características facilitam a sua absorção pelas membranas celulares e a chegada aos alvos desejados, se tornando acessível à organelas, como por exemplo as mitocôndrias, além de permitir a sua penetração da barreira hematoencefálica, fator importante quando se trata de doenças que afetam o SNC (González Escobar, 2002; Usta et al., 2002;

Nisar et al., 2021). Dessa forma, de acordo com as propriedades do eugenol apresentadas, justifica-se o interesse por esta molécula versátil, a qual se mostra como um bom candidato antitumoral.

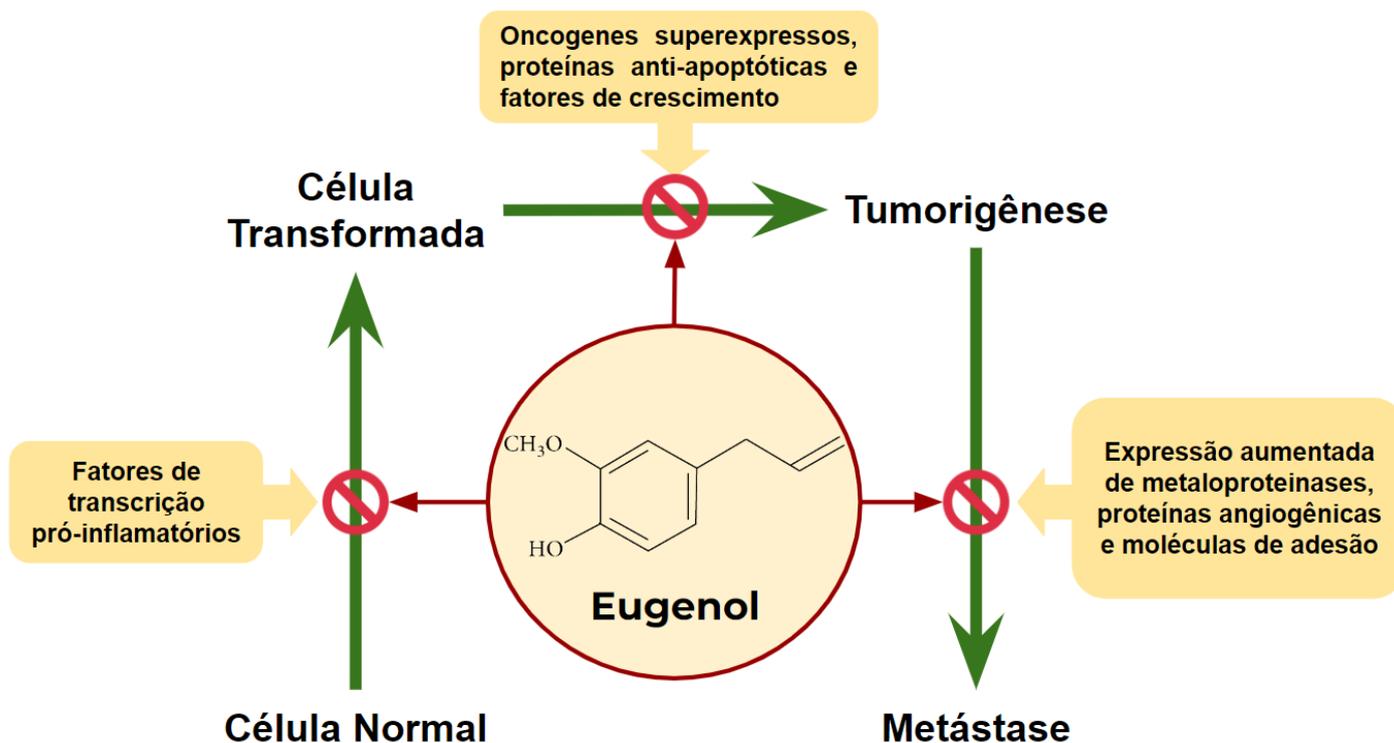


Fig 5. Mecanismos moleculares antitumorais do eugenol. Adaptado de Padhy et al., 2022.

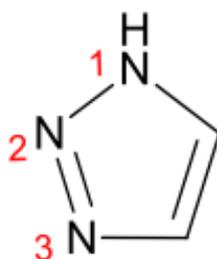
Sabe-se que a descoberta de novos fármacos quando se trata de fontes naturais pode ocorrer por diferentes formas, como por meio da utilização de extratos brutos, derivados semi sintéticos e derivados totalmente sintéticos (Mello, 2014).

A partir de substâncias naturais biologicamente ativas, a modificação molecular vem sendo utilizada como estratégia para potencializar os efeitos biológicos positivos, bem como para reduzir possíveis efeitos colaterais (Victoria et al., 2013; Da Silva et al., 2018; Zengin et al., 2020). Com isso, os produtos semissintéticos e também os análogos sintéticos baseados a partir de produtos naturais se demonstram importantes para as indústrias química, farmacêutica e de alimentos, por exemplo (Fonseca, 2017). Assim, tendo em vista a gama de mecanismos antitumorais do eugenol em diferentes tipos de câncer, além da possibilidade de potencializar os efeitos desta molécula, é de interesse no presente trabalho obter e avaliar o potencial biotecnológico de diferentes derivados triazólicos do eugenol para o tratamento do glioblastoma, sabendo que na literatura já é

descrito e relatado a utilização de derivados sintéticos de eugenol na busca por novas alternativas para o tratamento de câncer (Carrasco et al., 2008; Bar et al., 2010).

## 1.6. NÚCLEO 1,2,3 TRIAZOL

Os 1,2,3-triazóis são compostos heterocíclicos, aromáticos e nitrogenados de cinco membros, contendo três átomos de nitrogênio (**Fig.6**) (Bozorov et al., 2019; Alam, 2022). Esta classe de compostos são produzidos de forma sintética utilizando a reação 'click', ou seja, a cicloadição de azida-alcino catalisada por cobre (reação CuAAC) (Bozorov et al., 2019; Ouyang, et al., 2018).



**Fig 6.** Estrutura do 1,2,3 triazol (Melo et al., 2006)

Estes compostos têm despertado interesse nos últimos tempos por possuírem um amplo campo de aplicações. Estudos relatam propriedades antifúngicas, antibacterianas, antivirais, antiinflamatórias, antituberculares, inseticidas, anti-HIV, antiproliferativa, anticancerígenas, entre outras (Abdel-Wahab et al., 2012; Tripolszky et al., 2019; Alam, 2022; Dos Reis et al., 2022).

De acordo com a literatura, os efeitos anticancerígenos do 1,2,3 triazol ocorre por meio de diferentes mecanismos de ação, estes podem ser através da inibição da atividade de enzimas, tais como: anidrases carbônicas, timidilato sintase, aromatase, triptofano 2,3-dioxigenase, assim como também a inibição de receptores teciduais, como receptor do fator de crescimento endotelial vascular e o receptor do fator de crescimento epidérmico (Kim et al., 2010; Sanphanya et al., 2013; Röhrig et al., 2016; Banerji et al., 2018; Kumar et al., 2018; Baraniak et al., 2019; Alam, 2022).

O núcleo 1,2,3 triazol possui a capacidade de realizar interações com diferentes alvos através de ligações químicas, como ligações de hidrogênio,

dipolo-dipolo e empilhamento  $\pi$ . Sendo assim, ao ser incorporado a uma molécula bioativa, este pode melhorar a eficácia do novo derivado sintetizado (Dheer et al., 2017; Lima et al., 2022). Além disso, o 1,2,3 triazol também podem ser usados como ligantes entre duas ou mais substâncias de interesse a fim de promover a potencialização de suas atividades farmacológicas (Freitas, et al., 2011).

Com base na literatura, pesquisas realizadas com derivados 1,2,3 triazólicos já são relatadas e demonstram suas aplicações (Gazolla et al., 2018; Teixeira et al., 2018; De Almeida Lima et al., 2018; Rodrigues et al., 2019; De Oliveira et al., 2019). Desta forma, tendo em vista as propriedades já descritas para o eugenol e também para o 1,2,3 triazol, têm-se interesse na investigação do efeito antitumoral dos derivados de eugenol provenientes da união destas duas moléculas.

# Objetivos

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Triar e avaliar o potencial biotecnológico de derivados de eugenol como possíveis candidatos para tratamento de Glioblastoma.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito *in vitro* dos derivados de eugenol em células cancerígenas de glioblastoma, linhagem U87-MG, avaliando o metabolismo celular;
- Selecionar o derivado que apresentar melhor efeito na redução do metabolismo celular;
- Avaliar a citotoxicidade do derivado selecionado em células não tumorais;
- Avaliar o efeito do derivado na inibição da migração celular de células U87-MG;
- Avaliar o efeito do derivado na taxa de proliferação celular de células U87-MG;
- Avaliar o efeito do derivado na formação de colônias de células U87-MG.

# Metodologia

---

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. CULTIVO CELULAR**

As células da linhagem celular de glioblastoma humano, U87MG, foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cíntia Lopes de Brito Magalhães do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, obtidas comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células 3T3 (fibroblasto murino) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, obtidas da ATCC. As células J774 (macrofágo murino) foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Frank Silva Bezerra do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

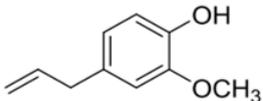
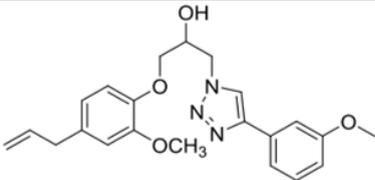
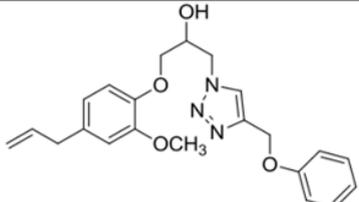
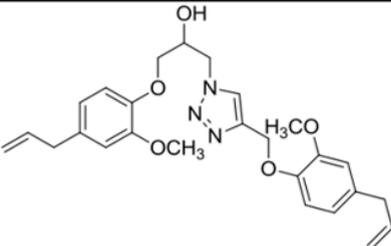
As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (pH 7,2; Thermo Fisher). O meio foi suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher), L-glutamina (0,2 g/ml) (Sigma-Aldrich) e penicilina/estreptomicina (100 U/ml de penicilina e 0,01 g/mL de estreptomicina) (LGC Biotecnologia). As células foram mantidas em estufa incubadora a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e repicadas quando atingiram aproximadamente 80-90% de confluência. Em experimentação, as células foram utilizadas na fase logarítmica de crescimento.

#### **3.2. OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS**

O eugenol e três compostos derivados a partir dele (**5V**, **5Y** e **5Z**) foram sintetizados pelo Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos, coordenado pelo Prof. Dr. Róbson Ricardo Teixeira, do departamento de química da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A síntese dos compostos estudados neste trabalho foi realizada através da junção da cadeia principal da molécula do eugenol à fragmentos 1,2,3-triazólicos, alterando apenas os radicais dessa junção. Suas fórmulas estruturais e as massas molares estão descritas no quadro 1. Os compostos utilizados foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Neon) em uma

concentração estoque de 20 mM, separados em pequenas alíquotas e armazenados a -80 °C.

**Quadro 1. Código, fórmula estrutural e massa molar de cada composto estudado.**

Código	Estrutura	Massa Molar (g/mol)
Eugenol		164,08
5v		395,18
5y		365,18
5z		465,23

### 3.3. ENSAIO DE METABOLISMO CELULAR

O eugenol e os compostos derivados (**5V**, **5Y** e **5Z**) foram submetidos ao ensaio de triagem de metabolismo celular, para avaliar e selecionar o(s) composto(s) que melhor reduzia(m) o metabolismo celular para ser(em) utilizado(s) nos ensaios subsequentes.

O metabolismo celular foi analisado pelo ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este método é uma ferramenta amplamente utilizada para rastrear potenciais drogas quimioterápicas em linhagens celulares (Berridge & Tan, 1993; Hayon et al., 2003). O ensaio se baseia na atividade de enzimas oxidoredutases em células metabolicamente ativas, que

reduzem o sal amarelo de MTT em cristais roxos denominados formazan, cuja a redução é proporcional a quantidade de células metabolicamente ativas. O método possibilita a triagem simultânea de diferentes drogas e concentrações, utilizando as mesmas condições experimentais, otimizando assim o uso de células e drogas (Mosmann, 1983; Berridge & Tan, 1993; Hayon et al., 2003; Do Vale et al., 2022).

Dessa forma, as células U87MG foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $1,5 \times 10^4$  células por poço. Após 24 horas de semeadura, o meio de cultura foi substituído e as células foram tratadas com os compostos em diferentes concentrações (50, 100 e 150  $\mu\text{M}$ ) durante 24, 48 e 72 horas. Para o controle, os poços foram tratados com DMSO (0,4% v/v). Decorrido o tempo de tratamento, o meio de cultura com tratamento foi retirado e 150  $\mu\text{l}$  de uma solução de MTT (0,5 mg/ml em DMEM) (Thermo Fisher) foram adicionados aos poços e as células foram incubadas overnight em estufa incubadora a 37 °C. Decorrido o tempo de incubação, o meio contendo MTT foi removido e foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  de DMSO a fim de solubilizar os cristais de formazan formados. Posteriormente, a placa foi agitada por uma hora e foi realizada a leitura da absorbância em 530 nm utilizando leitor de microplacas VICTOR™ X3 (PerkinElmer) (Sousa et al., 2021). Foi considerado o metabolismo celular de 100% das células no tratamento controle. Já o efeito dos compostos foi analisado como a porcentagem de absorbância em relação aos poços de controle.

Dados os resultados deste ensaio de triagem (**Tópico 4.1**), o composto 5V se mostrou o derivado mais promissor ao diminuir o metabolismo celular das células U87MG. Após selecionar este composto, a concentração inibitória média (IC50) na U87MG foi determinada através da análise de diferentes concentrações do composto (12,5; 25; 50; 100; 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. O cálculo foi feito utilizando-se o Software GraphPad Prism 8.0.2.

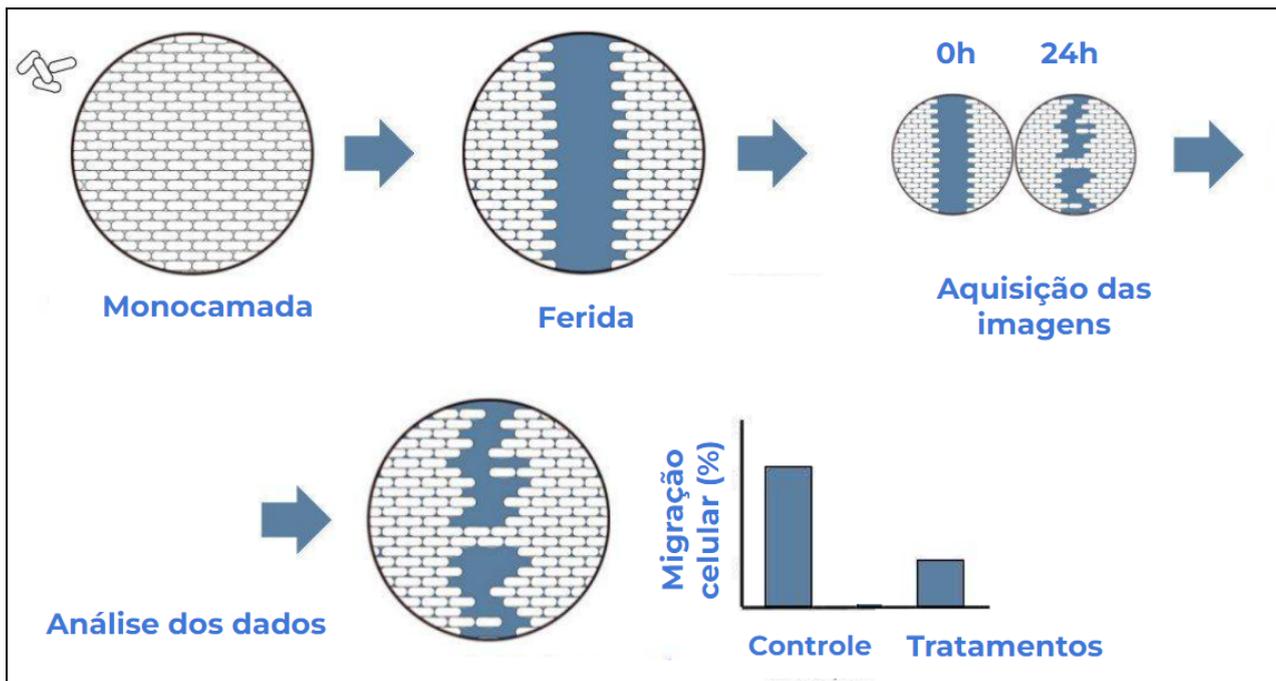
Após a determinação da concentração inibitória média, o composto escolhido foi testado nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  em linhagens celulares não tumorais de macrófagos (J774) e fibroblastos (3T3) a fim de avaliar seu potencial citotóxico para além das células tumorais. Estes ensaios ocorreram de acordo com o mesmo procedimento descrito acima.

Para os ensaios foram realizados dois experimentos independentes em sextuplicata (n=12).

### 3.4. ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDA

A capacidade do composto **5V** para inibir a migração celular foi analisada usando o ensaio de cicatrização de feridas (**Fig. 6**). O ensaio se baseia em criar uma ferida através de um arranhão e avaliar a taxa de migração das células através dessa ferida (Almeida et al., 2020). Para isso, as células U87MG foram plaqueadas em uma densidade de  $1,0 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços. Após 24 horas de plaqueamento e a confluência das células formando uma monocamada, foi feito um risco simulando uma ferida em cada poço, usando uma ponta de pipeta estéril de 200  $\mu$ l (kasvi). Logo após a confecção das feridas, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com meio fresco para a remoção de *debris* que foram desprendidos durante o procedimento. Posteriormente, as células foram tratadas com o composto **5V** nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu$ M utilizando DMEM suplementado com 2% de SFB, durante 24 horas. O tratamento com DMSO (0,4% v/v) foi usado como controle. Foram obtidas fotos de dois campos da ferida por poço em cada tempo usando um microscópio invertido AE2000 (Motic, New Route), acoplado a uma câmera fotográfica (AmScope MU300) utilizando uma objetiva de 20x. As imagens foram capturadas no mesmo local, no momento em que a ferida foi realizada (0h) e 24 horas após o tratamento. Todas as imagens de migração celular foram analisadas usando o Software ImageJ. Foi realizada uma média da área entre as duas imagens por cada poço/tempo. O fechamento das feridas foi calculado como a diferença entre a área da ferida em 0h e 24h, ou seja, área inicial e área final, respectivamente. Os resultados são expressos em porcentagem de migração celular.

Para este ensaio, foram realizados dois experimentos independentes em sextuplicata (n=12).



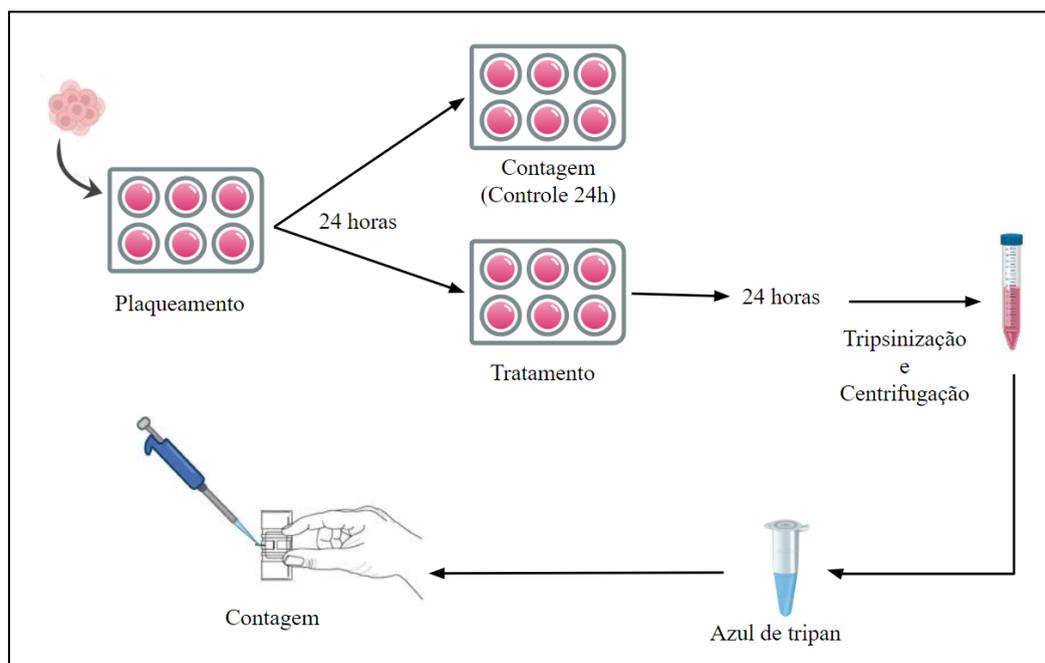
**Fig 7.** Representação esquemática do ensaio de migração celular.

Adaptado de: <https://cytosmart.com/resources/resources/wound-healing-assay-what-why-and-how>

### 3.5. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para avaliar a atividade antiproliferativa do composto 5V (**Fig. 7**) (Teixeira et al., 2013), as células U87MG foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de  $1,0 \times 10^5$  células por poço. Após 24 horas de plaqueamento, 3 poços do controle 24 horas foram contados a fim de se observar o quanto as células proliferaram até o momento do tratamento. O restante dos poços foram tratados em diferentes concentrações do composto (25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) por um período de 24 horas. O controle de 48 horas recebeu meio suplementado com DMSO (0,4% v/v). Decorrido o tempo de tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de azul de tripan.

Para este ensaio, foram realizados dois experimentos independentes em triplicata (n=6). Os resultados estão expressos em números absolutos de células.



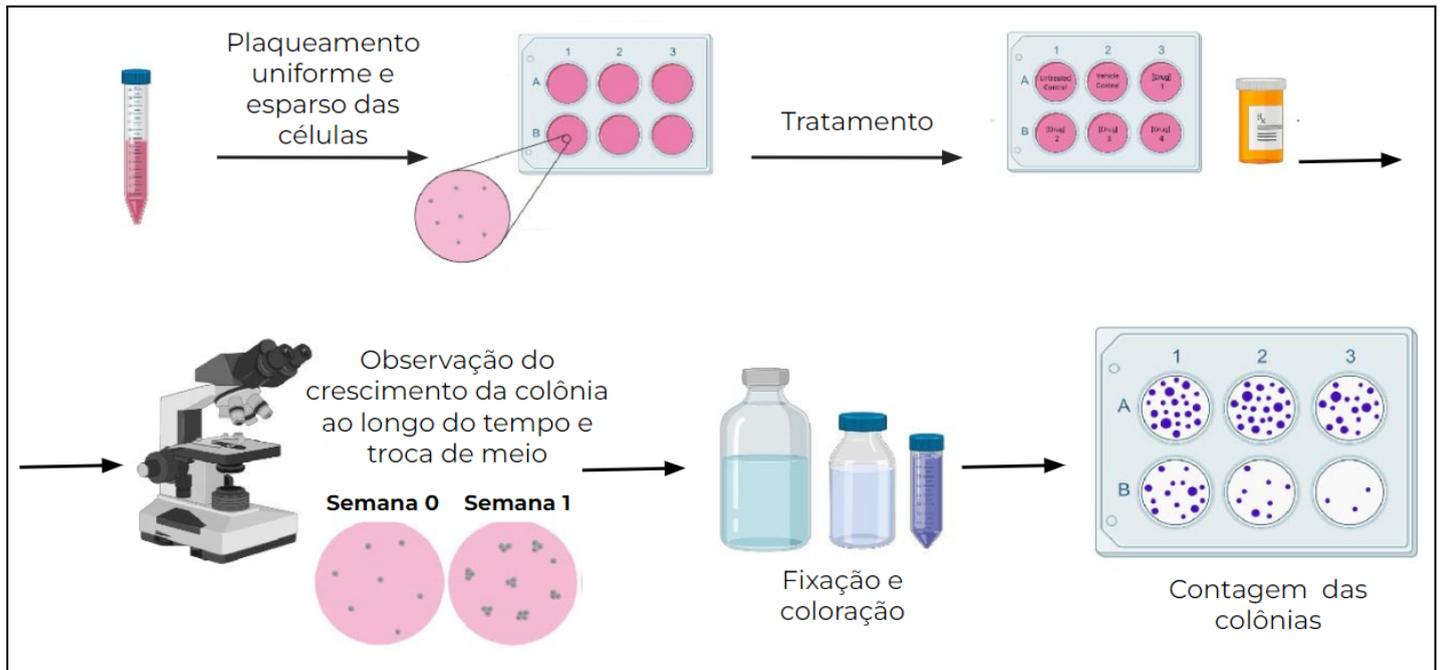
**Fig 8.** Representação esquemática do ensaio de proliferação celular  
(Elaborado pela autora)

### 3.6. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

O ensaio de formação de colônias serve como uma boa ferramenta para avaliar se determinada droga contra o câncer pode reduzir a sobrevivência e proliferação clonogênica das células tumorais. O ensaio se baseia na capacidade de células individuais de proliferar e se transformar em uma colônia (**Fig. 8**) (Yang, 2012). Para isso, as células U87MG foram plaqueadas em placas de 6 poços em uma densidade de  $1 \times 10^3$  células por poço. Após 24h, as células foram tratadas com o composto 5V nas concentrações de 12,5; 25 e 50  $\mu\text{M}$ , utilizando DMEM suplementado com 2% de SFB, durante 24 horas. Os poços controle foram tratados com veículo DMSO (0,4% v/v) em DMEM suplementado com 2% de SFB. Após o tratamento, o meio foi trocado por meio completo, e as células foram cultivadas durante 7 dias. A cada dois dias o meio de cultura foi trocado por meio fresco para garantir os nutrientes necessários para as células. Decorrido o tempo de incubação, as colônias foram então fixadas com paraformaldeído (4% v/v) por 40 minutos em temperatura ambiente e coradas com azul de toluidina. As placas foram lavadas em água corrente e deixadas para secar à temperatura ambiente. As capturas dos poços foram obtidas através de uma lupa estereoscópica. As imagens das colônias

foram contadas usando o software ImageJ e para o controle foi considerado como 100% a formação das colônias. Já nos tratamentos, os resultados foram expressos como uma porcentagem das culturas em relação ao controle.

Para este ensaio, foram realizados dois experimentos independentes em triplicata (n=6).



**Fig 9.** Representação esquemática do ensaio de colônia. Adaptado de: <https://cytosmart.com/resources/resources/clonogenic-assay-what-why-and-how>

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do Software GraphPad Prism 8.0.2. Os resultados foram submetidos à análise de One-way ANOVA, seguido do teste de Dunnett ou Two-way ANOVA, seguido do teste de Tukey, conforme especificado em cada legenda. Os valores numéricos foram colocados sob a forma média  $\pm$  desvio padrão (SD). Para a realização do cálculo do IC50 o mesmo software foi utilizado, analisando os resultados por regressão não linear. Valores de  $p \leq 0.05$  (\*) foram considerados estatisticamente significativos.

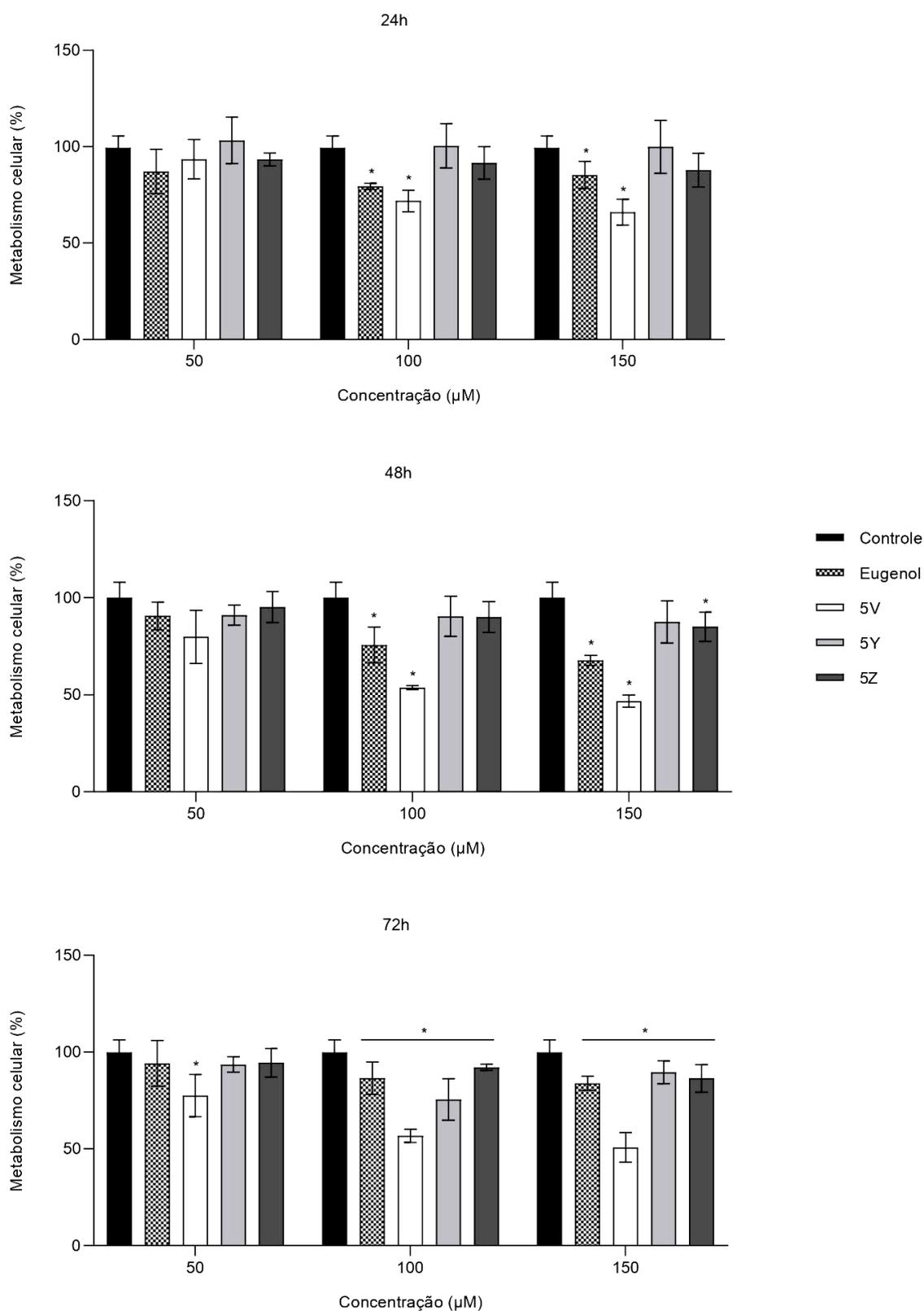
# Resultados

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ENSAIO DE METABOLISMO CELULAR

O eugenol e seus compostos derivados **5V**, **5Y** e **5Z** foram inicialmente avaliados com respeito aos seus efeitos citotóxicos contra a linhagem U87MG. Esta linhagem foi tratada com diferentes concentrações dos compostos (50, 100 e 150  $\mu\text{M}$ ) por diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). Os testes foram realizados em dois experimentos independentes em triplicata e os resultados obtidos para o metabolismo celular estão representados na **Figura 9**.



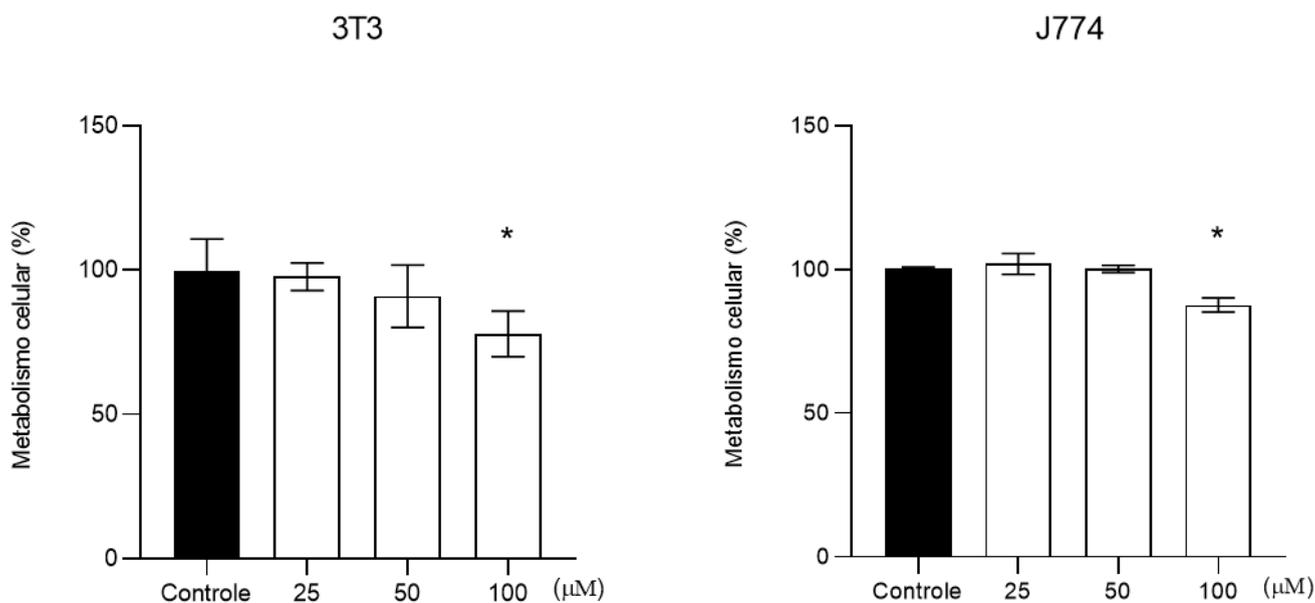
**Fig 10.** Avaliação do metabolismo celular por MTT em células da linhagem U87MG após o tratamento com o eugenol e os derivados **5V**, **5Y** e **5Z**, comparados ao controle. As barras representam a média  $\pm$  SD do metabolismo celular em percentual para cada derivado x concentração x tempo estudados, após tratamento com os compostos. A análise estatística foi avaliada através do teste Two-Way ANOVA, com  $p \leq 0.05$  (\*).

Os resultados do ensaio de metabolismo celular mostram que nos tempos de 24 e 48 horas e na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , nenhum dos compostos foram capazes de reduzir o metabolismo celular de forma significativa. Em contrapartida, quando se analisa o eugenol e o composto **5V** nestes mesmos tempos, ambos apresentam diferença significativa do controle quando tratados com as concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$ , reduzindo assim o metabolismo celular. Já o composto **5Z** apresenta diferença significativa apenas 48 horas após a incubação e na maior concentração testada de 150  $\mu\text{M}$ . Com o aumento do tempo de incubação, em 72 horas após a incubação, apenas o composto **5V** apresenta diferença significativa na concentração de 50  $\mu\text{M}$  e os demais compostos apresentam redução do metabolismo nas concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$ .

Dessa forma, os resultados do ensaio de triagem mostraram que o composto **5V** foi o derivado triazólico do eugenol mais citotóxico em relação ao próprio eugenol e os compostos **5Y** e **5Z**, diminuindo assim o metabolismo celular das células U87MG se comparadas ao veículo DMSO (controle). Os dados gerados pelos resultados deste experimento nos permitiram inferir que os efeitos citotóxicos observados para o composto **5V** são dose-tempo dependentes. Com base nestas observações, o composto **5V** foi escolhido para as análises subsequentes.

Dados os resultados de triagem e a escolha do derivado **5V**, uma nova alíquota foi sintetizada e testada para se analisar o IC<sub>50</sub> com diferentes concentrações do composto (12,5; 25; 50; 100; 150 e 200  $\mu\text{M}$ ). Após a obtenção do gráfico de dose resposta ( $R^2= 0,93$ ), o IC<sub>50</sub> estabelecido para o composto **5V** foi de aproximadamente 48,53  $\mu\text{M}$ .

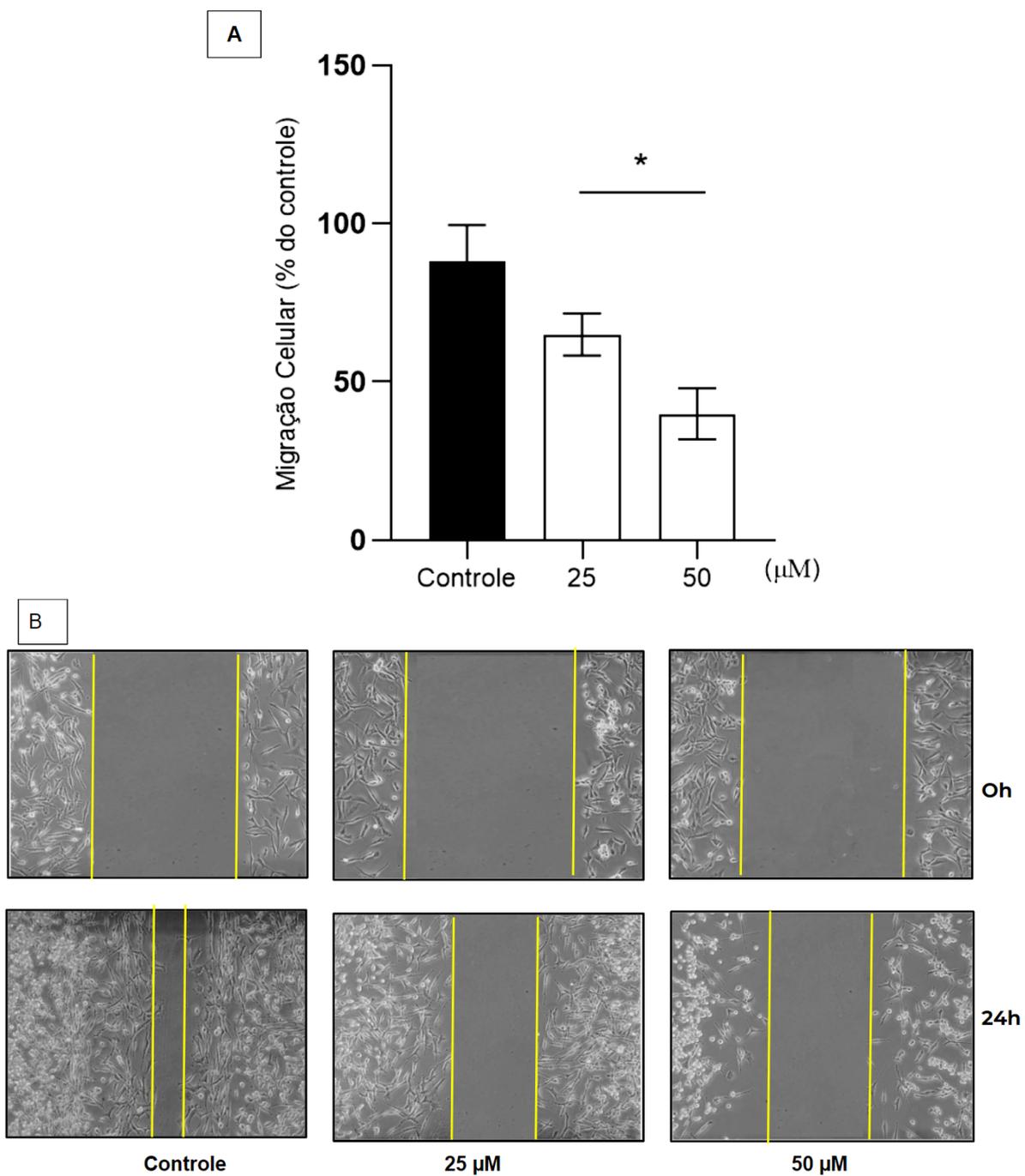
Adicionalmente, avaliamos o efeito deste composto em células não tumorigênicas de macrófagos (J774) e fibroblastos (3T3) (**Fig.10**). O composto **5V** não foi capaz de reduzir significativamente o metabolismo das células nos tratamentos em comparação ao controle, nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  para as duas linhagens. Na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , ou seja, uma concentração acima a do IC<sub>50</sub> para a U87MG, o derivado **5V** reduziu o metabolismo de ambas as linhagens (3T3: 77%; J774: 87%) de forma significativa.



**Fig 11.** Avaliação do metabolismo celular por MTT em células da linhagem 3T3 e J774 após o tratamento com o derivado **5V**, comparados ao controle. As barras representam a média  $\pm$  SD do metabolismo celular em percentual, para cada concentração x linhagem estudadas após tratamento com o composto. A análise estatística foi avaliada através do teste One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett, com  $p \leq 0.05$  (\*).

## 4.2. ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

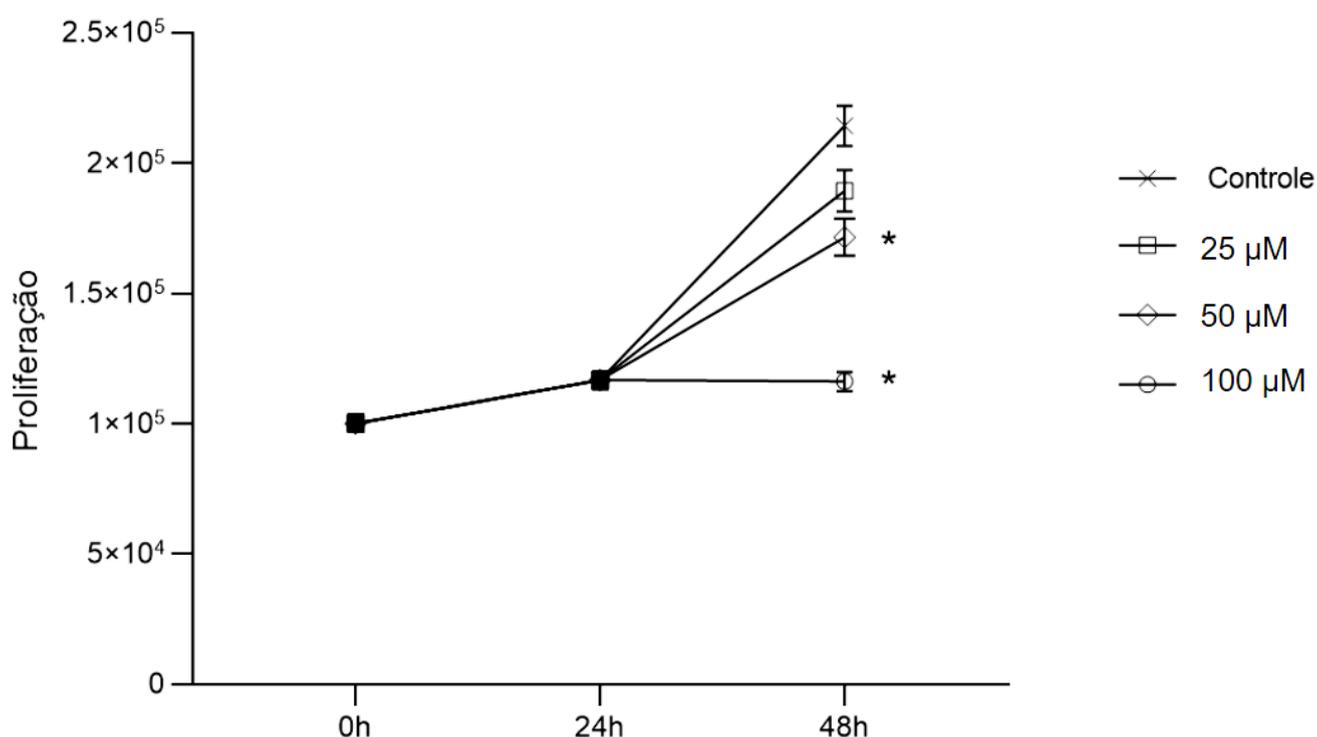
A capacidade do composto **5V** de interferir no processo migratório das células tumorais de glioblastoma humano (U87MG) foi analisada através do ensaio de cicatrização de feridas. Através dos resultados apresentados na figura **12-A**, observa-se que após o tempo de incubação de 24 horas, a concentração de 25 $\mu$ M apresentou uma taxa de fechamento de ferida de 65%, valor estatisticamente inferior ao apresentado pelo controle (85%). Na concentração de 50 $\mu$ M, podemos observar uma taxa de fechamento de aproximadamente 40%, sendo esta inferior à observada em tratamentos com 25 $\mu$ M. Com base nas imagens microscópicas capturadas para cada um dos tratamentos (**Fig. 12-B**), percebe-se que além de inibir a taxa de cicatrização das feridas, o composto **5V**, nas concentrações utilizadas, foi capaz de provocar alteração na morfologia e também promoveu efeito citotóxico para as células, à medida que a concentração foi aumentada, sendo que na concentração de 100 $\mu$ M as células morreram durante a incubação, após o tratamento (dados não mostrados).



**Fig 12.** Efeito do derivado 5V na migração celular em células U87MG. (A) Gráfico de porcentagem da taxa de fechamento da ferida, comparados ao controle (Barra: Média  $\pm$  SD); (B) A fotomicrografia corresponde a uma das triplicatas representativa do experimento (Aumento de 20x). A análise estatística foi avaliada através do teste One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett, com  $p \leq 0.05$  (\*).

### 4.3. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

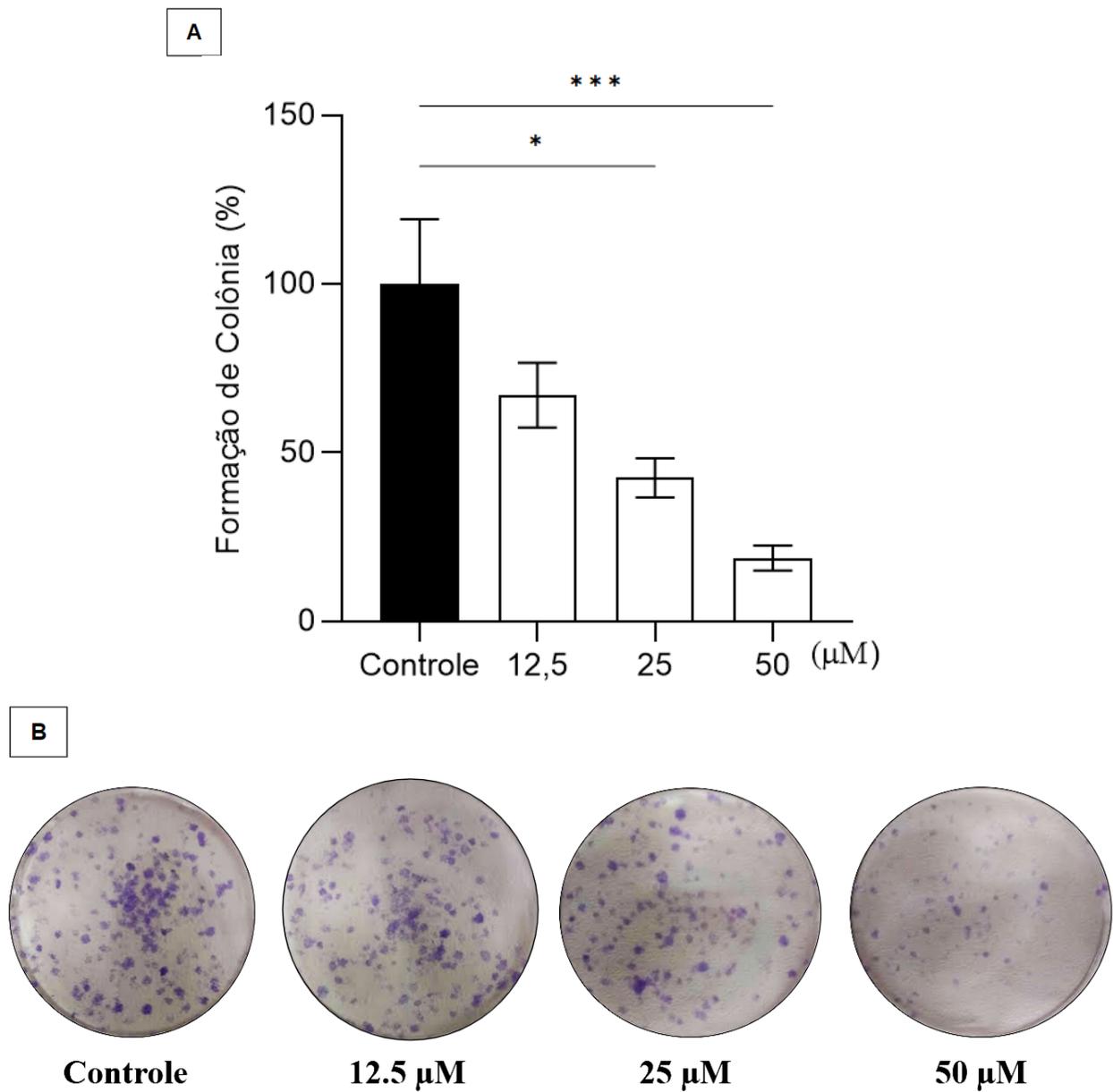
No ensaio de proliferação celular, as células U87MG foram inicialmente plaqueadas em uma densidade de  $1 \times 10^5$  por poço (tempo 0h). A curva no tempo 24h indica que houve uma pequena proliferação das células ( $1,2 \times 10^5$  células/poço) antes do tratamento. Nesta etapa, o composto 5V foi adicionado aos poços nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , salvo o controle, que permaneceu sem tratamento com o derivado. Após as 24 horas de tratamento, na concentração de 25  $\mu\text{M}$  ( $1,9 \times 10^5$  células/poço) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em comparação às células não tratadas ( $2,1 \times 10^5$  células/poço). Nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  houve uma queda significativa na proliferação celular, reduzindo o número de células por poço à  $1,7 \times 10^5$  e  $1,2 \times 10^5$ , respectivamente (**Fig.13**).



**Fig 13.** Avaliação da proliferação de células U87MG após o tratamento com o composto 5V, comparadas ao controle (Barra: Média  $\pm$  SD). A análise estatística foi avaliada através do teste Two-Way ANOVA, com  $p \leq 0,05$  (\*).

#### 4.5. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

A capacidade clonogênica de células isoladas, U87MG, após o tratamento com o composto **5V** foi evidenciada no ensaio de formação de colônia. Ao se multiplicarem, estas células isoladas começam a formar pequenos agregados. A figura **14-B** representa, microscopicamente, o quanto as células foram capazes de proliferar durante 7 dias após a exposição ao composto **5V**. As concentrações utilizadas no ensaio clonogênico foram concentrações menores ou iguais ao IC50. Podemos observar com os resultados que todas as concentrações testadas 12,5; 25 e 50 $\mu$ M do composto **5V** inibiram significativamente a formação de colônias, para 67%, 42,5% e 18,7% (respectivamente), quando comparadas com o controle sem tratamento (**Fig. 14-A**). Destacando a concentração de 50 $\mu$ M (18,7%), observa-se que nela houve uma inibição expressiva da formação das colônias. Com base nestes resultados, o composto **5V** demonstrou ser capaz de inibir a formação de agregados de células tumorais da linhagem U87MG e de diminuir também o tamanho destes, tendo assim, um efeito citotóxico e citostático.



**Fig 14.** Efeito do derivado 5V na formação de colônias em células U87MG, após tratamento de 7 dias nas concentrações estudadas, comparados ao controle. (A) Gráfico de porcentagem do número de colônias (Barra:Média  $\pm$  SD) (\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  ); (B) A fotomicrografia corresponde a uma das triplicatas representativa do experimento.

# Discussão

---

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, descrevemos a triagem de novos compostos derivados do eugenol, a fim de selecionar a(s) molécula(s) que melhor se destacasse(m), reduzindo o metabolismo em células da linhagem U87MG, em busca de possíveis candidatos terapêuticos para o tratamento do glioblastoma.

Vimos com os resultados do ensaio de metabolismo celular que o eugenol, molécula a partir da qual os derivados foram baseados, apresentou atividade citotóxica, nas concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$  em todos os três tempos testados. Padhy et al., 2022 em sua revisão, relata e descreve a eficácia do eugenol contra várias linhagens de células tumorais como próstata, mama, colo do útero, leucemias, osteossarcoma, pulmão, melanoma, gliomas, entre outros. Li et al., 2020 investigaram o efeito do Nanopolímero de quitosana carregado com o eugenol na viabilidade de células da linhagem C6 (glioma de rato) onde as células tiveram uma redução significativa na viabilidade de 40% e 60% em 7,5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Na pesquisa de Liang et al., 2015, em células da linhagem DBTRG-05MG (glioblastoma humano), o eugenol foi citotóxico para as células em todas as concentrações testadas (100-500  $\mu\text{M}$ ). Investigando a causa da citotoxicidade causada pelo eugenol, os autores descreveram que esta se dá através da via mitocondrial da apoptose (dependente da concentração). Esta apoptose ocorreu devido a produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo  $c$  e ativação de caspase-9/caspase-3.

A faixa de concentração de eugenol e seus derivados, escolhida para o ensaio de metabolismo celular em células U87-MG, têm sido utilizadas em outros estudos *in vitro*, com diferentes linhagens de células tumorais. Foi demonstrado que o eugenol em concentrações de 40-200  $\mu\text{M}$  por 48h levou à inibição da fosforilação oxidativa e oxidação de ácidos graxos em células MCF10A-ras (células epiteliais de mama humana transfectadas com o oncogene H-ras) (Yan et al., 2017). Permatasari et al., 2019 em seu estudo, observou que o óleo de cravo, contendo o composto ativo eugenol, levou a ativação da proteína p53 e caspase-3 em células HeLa (câncer cervical) quando administrados em concentrações de 50-200  $\mu\text{M}$  por 24h. Além disso, a redução da viabilidade celular, quando estas células foram tratadas nestas mesmas concentrações durante 24, 48 e 72h também foi observada, sendo

que a diminuição da viabilidade celular foi dose e tempo dependentes. Assim, os dados encontrados na literatura sobre a atividade citotóxica do eugenol em diferentes linhagens celulares corroboram nossos achados na linhagem U87MG, nas concentrações de 100 e 150  $\mu\text{M}$ .

Estudos com concentrações de eugenol ainda maiores ou iguais também foram descritas para outros tipos de linhagens celulares, como Caco-2 e SW-620 (600-1000  $\mu\text{M}$ ); HT-29 (100-700  $\mu\text{M}$ ); HB8065 (50-1500  $\mu\text{M}$ ); A549 (50-1000  $\mu\text{M}$ ) (Petrocelli et al., 2021; Ghodousi-Dehnavi et al., 2021; Majeed et al., 2014; Fangjun & Zhijia., 2018). Neste presente trabalho, o eugenol foi capaz de reduzir o metabolismo celular das células U87MG em concentrações menores ou iguais, se comparadas àquelas estudadas pelos autores citados anteriormente. Porém, o derivado 5V, foi significativamente mais ativo que o próprio eugenol no ensaio de triagem de metabolismo celular, o que despertou um interesse particular nesta molécula.

Nos últimos anos, estudos demonstram que os produtos naturais ou derivados sintetizados a partir deles possuem grandes atividades biológicas. Devido a isso, a descoberta de medicamentos, principalmente de origem natural ou semi sintética têm chamado a atenção e sido pesquisada (Bendre et al., 2016). Carrasco et al., 2012 sintetizaram e avaliaram derivados do eugenol que mostraram atividades antifúngicas. Em outro estudo realizado por Carrasco et al. 2008, foi explorado *in vitro* as atividades anticarcinogênicas do eugenol e seus derivados contra as linhagens celulares DU-145 (células de câncer de próstata insensíveis a andrógenos) e KB (células de carcinoma escamoso oral) através do ensaio de MTT. Neste estudo, os derivados reduziram significativamente o crescimento de células tumorais humanas. Bar e cols, 2010 descreveram compostos citotóxicos derivados do eugenol como inibidores da invasão do câncer de mama. Dessa forma, encontramos na literatura, exemplos de atividades biológicas já descritas e estudadas com derivados do eugenol.

Após a escolha do derivado 5V com base em seus resultados significativos no ensaio de metabolismo celular, uma nova alíquota foi sintetizada e testada para se analisar o IC50. Este parâmetro indica o valor da concentração inibitória necessária para reduzir pela metade o metabolismo celular. Portanto, quanto menor for o valor de IC50, mais eficiente será o composto (Costa et al., 2020). Após a obtenção do gráfico de dose resposta, o IC50 estabelecido para o composto 5V foi

de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ . O glioblastoma geralmente apresenta altos valores de IC50 para seu tratamento padrão com a temozolomida (TMZ) (Ananta et al., 2015). De acordo com o trabalho de Poon et al., 2021 a linhagem U87MG quando tratada com temozolomida por 24h, apresentou IC50 de 123,9  $\mu\text{M}$ . Já no trabalho de Liu et al., 2015 as linhagens U251, U118 e SHG-44 quando tratadas com TMZ por 72h, apresentam IC50 maiores que 320  $\mu\text{M}$  ao passo que a linhagem U87MG apresentou IC50 de 135  $\mu\text{M}$ . Assim, o IC50 do composto 5V se encontra abaixo dos valores encontrados para a temozolomida, medicamento padrão para o tratamento do GBM, em diferentes linhagens celulares.

Embora o IC50 seja um parâmetro utilizado por muitos estudos, também é crucial para o estudo da farmacologia de antineoplásicos, analisar o efeito do composto sobre linhagens celulares não tumorigênicas, pois é preciso a busca por quimioterápicos que não sejam tóxicos às células normais, a fim de amenizar os efeitos colaterais que acometem os pacientes oncológicos (Souza et al., 2018). De acordo com a FDA (Food and Drug Administration) o eugenol é seguro, além de ser considerado não cancerígeno e não mutagênico para humanos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, seu limite de absorção é de até 2,5 mg/kg por dia (Jaganathan & Supriyanto, 2012; Bendre et al., 2016). Hussain et al., 2011 demonstraram em seu estudo que o eugenol (10 $\mu\text{M}$ -1mM) induz citotoxicidade seletiva em células HeLa quando tratadas por 24h e que não houve efeito citotóxico significativo do eugenol em linfócitos isolados de um adulto saudável. Em nosso estudo, o eugenol induziu a diminuição do metabolismo celular nas células J774 e 3T3 em concentração acima do IC50 encontrado para a U87MG. Chen et al., 2009 em seus experimentos demonstraram que o eugenol puro causou mortes de células 3T3 acima da concentração de 0,31 mg/mL, mas quando este óleo foi encapsulado com nanopartículas de quitosana, essa citotoxicidade diminuiu. Assim, uma alternativa para driblar o possível efeito citotóxico que este composto possa apresentar para as células normais, seria o encapsulamento do derivado para potencializar a estabilidade e eficácia de liberação da droga, otimizar e direcionar sua entrega para células cancerígenas, em vez de células saudáveis, dentre outros aspectos (Silva et al. 2013; Padhy et al., 2022). Além disso, seria interessante testar o derivado 5V em células de linhagem normal humana, para avaliar se este padrão também se repetiria.

Além do efeito do derivado 5V no metabolismo celular, outro parâmetro analisado no presente trabalho foi seu efeito na migração celular. Uma das principais causas de morte em pacientes com câncer é a metástase, um processo complexo que envolve adesão, migração e invasão celular. Adicionalmente para o glioblastoma, a migração agressiva das células tumorais explica a recidiva da doença e a baixa sobrevida dos pacientes (Boccellato & Rehm, 2022). Em nosso estudo demonstramos que as células U87MG apresentaram redução na migração celular em comparação com as células de controle quando tratadas com o derivado 5V nas concentrações de 25 e 50 $\mu$ M por 24h. Células da linhagem C6 tratadas com o eugenol encapsulado com nanopolímero de quitosana, apresentaram indução da atividade apoptótica e anti metastática. O eugenol foi capaz de inibir a expressão da proteína NF-  $\kappa$ B, MMP-9 e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (Li et al., 2020). Permatasari et al., 2021 demonstraram que células HeLa quando tratadas com 0, 50, 100 e 200  $\mu$ M de eugenol durante 72 horas apresentaram porcentagem de migração celular de 53,4%, 42,5%, 23,7% e 15,4%, respectivamente. Rajoriya et al., 2019 observaram que uma concentração de 25  $\mu$ M de eugenol inibiu significativamente a migração celular e suprimiu a metástase de células MDA MB-231 (câncer de mama triplo negativo) em 24 e 48h. De acordo com esta pesquisa, o eugenol apresenta efeitos anti-cancerígeno, anti-proliferativos e anti-metastáticos através do seu direcionamento à metaloproteinase da matriz. Com base em nossos resultados e na literatura, o derivado 5V se mostrou uma importante ferramenta de prevenção da metástase e da invasão das células cancerígenas, por possuir esse papel anti-migratório, in vitro, em células cancerígenas de glioblastoma.

As células de câncer se caracterizam por apresentar uma proliferação celular descontrolada (Hanahan & Weinberg, 2011). Característica essa, marcante em tumores agressivos como por exemplo o glioblastoma. Dessa forma, avaliar a capacidade antiproliferativa in vitro, tanto de uma única célula quanto de células em conjunto é uma etapa crucial para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos (Souza et al., 2018). Em nosso trabalho investigamos o efeito do derivado 5V para inibir a proliferação de células de glioblastoma. Os resultados indicaram que o derivado inibiu a proliferação, sendo capaz de reduzir significativamente a proliferação das células para 80% e 57% quando estas células foram tratadas com 50 e 100  $\mu$ M, respectivamente. Pisano et al., 2007 avaliaram a

atividade antiproliferativa do eugenol e seis derivados contra linhagens celulares de melanoma. Os autores observaram que o eugenol e isoeugenol não apresentaram atividade antiproliferativa contra as linhagens quando tratadas com 100  $\mu$ M por 24 horas. Por outro lado, os derivados diminuíram a taxa de crescimento celular das linhagens. Ghosh et al., 2005 relataram que o eugenol foi capaz de inibir a proliferação das células de melanoma maligno. Quando camundongos B16 receberam um xenoenxerto, o tratamento com eugenol (125 mg/kg, duas vezes por semana) foi capaz de atrasar significativamente o crescimento do tumor, levando a uma diminuição em cerca de 40% no tamanho do tumor. Cerca de 50% dos animais sem tratamento morreram em decorrência do crescimento metastático, enquanto que no grupo tratado, nenhum apresentou qualquer sinal de invasão ou metástase. Carrasco et al., 2008 avaliaram o efeito do eugenol e seus análogos na proliferação celular de duas linhagens celulares de câncer humano (DU-145 e KB). De acordo com os autores, todos os compostos mostraram atividade de inibição do crescimento celular nas células cancerígenas examinadas. No estudo realizado por Shin et al., 2007, o eugenol foi capaz de reduzir significativamente a proliferação celular da linhagem HOS (osteossarcoma) de forma dependente da dose e induzir uma morte celular do tipo apoptótica.

Ao migrarem e invadirem os tecidos circunvizinhos, as células do glioblastoma acabam escapando da ressecção tumoral completa, sendo a principal causa de reincidência tumoral. Dessa forma, o ensaio de formação de colônia é uma ferramenta útil para avaliar a capacidade proliferativa de células individuais. No trabalho de Fangjun & Zhijia, 2018 o eugenol foi capaz de reduzir o crescimento clonogênico de células A549 (câncer de pulmão), quando estas foram tratadas com 400  $\mu$ M durante 24h. Já De sa junior et al., 2016 relatou que o eugenol apresentou capacidade inibitória da formação de colônias nas linhagens (MDA-MB-231, MCF-7 (câncer de mama), SIHA (câncer de colo do útero) e células de melanoma (SK-Mel-28 e A2058). Além disso, o eugenol levou à alterações morfológicas das colônias tratadas. Através dos nossos resultados evidenciados no ensaio de formação de colônia, constatamos que o tratamento com o derivado 5V levou a uma redução do potencial proliferativo e do número de colônias em todas as três concentrações avaliadas. Refletindo sobre as condições da doença, isso indica um resultado promissor, pois, por mais que a ressecção tumoral não seja capaz de eliminar todas as células malignas, as células restantes proliferariam menos e mais

lentamente, levando assim à diminuição da progressão tumoral e consequentemente a recidiva da doença.

# Considerações finais

---

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Glioblastoma é uma doença extremamente agressiva e aqueles que recebem este diagnóstico apresentam um prognóstico ruim. Ainda não existe um tratamento que seja totalmente eficaz e que leve à cura dos pacientes, sendo que as terapias atuais auxiliam apenas no aumento da sobrevida do paciente. Dessa forma, o presente trabalho avaliou o eugenol e seus 3 derivados como candidatos a fármacos para o tratamento do glioblastoma. Para isto, utilizamos a linhagem U87MG e empregamos metodologias acessíveis ao laboratório em tempos de pandemia.

Para avaliar a capacidade dos compostos em reduzir o metabolismo celular utilizamos o ensaio de MTT, no qual o composto 5V foi o que mais se destacou se mostrando citotóxico para as células U87MG. A partir daí, avaliamos alguns dos pontos chaves para o estabelecimento e progressão tumoral como a proliferação, migração e formação de colônias.

Com base em nossos achados descritos anteriormente, o derivado 5V se mostrou um inibidor eficaz em todas as metodologias testadas na linhagem U87MG, exibindo um importante efeito anti-cancerígeno *in vitro*, sendo este, o primeiro estudo a avaliar o potencial biotecnológico deste composto.

Em contrapartida, foi observado um efeito citotóxico em células não tumorais quando estas foram tratadas com a maior concentração utilizada. Com base nestas observações, nosso próximo objetivo para esta pesquisa é encapsular este derivado em busca de diminuir seu possível efeito citotóxico para células normais humanas. Além disso, o encapsulamento será útil para direcionar e auxiliar a entrega da droga às células tumorais. Visto que, se tratando de um câncer que acomete o SNC, é imprescindível avaliar a capacidade do composto de atravessar a barreira hematoencefálica e caso apresente dificuldade neste processo é preciso buscar uma alternativa *drug delivery* para conduzi-lo ao local de interesse. De acordo com resultados promissores, o derivado isolado, em combinação com outros quimioterápicos convencionais e/ou encapsulado, pode se apresentar como um candidato viável para o desenvolvimento de um fármaco derivado a partir do

eugenol com propriedades antiproliferativas e antimetastáticas para o tratamento do glioblastoma.

Outro ponto interessante de ser investigado é a ação do derivado 5V em outras linhagens tumorais, visto que o eugenol, molécula a partir da qual ele foi sintetizado, é amplamente estudado pela comunidade científica em outras linhagens de câncer como pulmão, mama, próstata, melanoma entre outras.

Esta pesquisa nos permitiu selecionar um derivado que até então se mostra promissor contra células de GBM, utilizando metodologias simples e acessíveis. Com base nesta pesquisa inicial, podemos aprofundar nossa investigação, sabendo que o derivado afeta parâmetros como metabolismo celular, proliferação, migração e formação de colônias. Embora interessantes, esses resultados devem ser tratados com cautela e estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação, moleculares e bioquímicos deste composto nas células de GBM, visto que, este trabalho é o primeiro estudo envolvendo esses derivados inéditos do eugenol.

## **7. CONCLUSÃO**

Através deste estudo foi possível observar que o derivado 5V inibiu o metabolismo, a proliferação, migração e capacidade clonogênica em células da linhagem U87MG, se mostrando potencialmente eficaz e útil para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento do glioblastoma.

# Referências

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, Bakr F. et al. Design and synthesis of new 4-pyrazolin-3-yl-1, 2, 3-triazoles and 1, 2, 3-triazol-4-yl-pyrazolin-1-ylthiazoles as potential antimicrobial agents. **European Journal of medicinal chemistry**, v. 52, p. 263-268, 2012.

ABDULLAH, Mashan L. et al. Anti-metastatic and anti-proliferative activity of eugenol against triple negative and HER2 positive breast cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.

ABU-HELIL, Bushra; VAN DER WEYDEN, Louise. Metastasis in the wild: investigating metastasis in non-laboratory animals. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 36, p. 15-28, 2019.

ALAM, Mohammad Mahboob. 1, 2, 3-Triazole hybrids as anticancer agents: a review. **Archiv der Pharmazie**, v. 355, n. 1, p. 2100158, 2022.

ALDAPE, Kenneth et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta neuropathologica**, v. 129, p. 829-848, 2015.

ALEXANDER, Brian M.; CLOUGHESY, Timothy F. Adult glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 21, p. 2402-2409, 2017.

ALMEIDA, Vera Lúcia de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ALMEIDA, Vitor M. et al. Triagem de drogas anticâncer: padronização do ensaio de ranhura in vitro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, p. 606-619, 2020.

AL-HOLOU, Wajd N. et al. Subclonal evolution and expansion of spatially distinct THY1-positive cells is associated with recurrence in glioblastoma. **Neoplasia**, v. 36, p. 100872, 2023.

AL-SHARIF, Ibtehaj; REMMAL, Adnane; ABOUSSEKHRA, Abdelilah. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation. **BMC cancer**, v. 13, p. 1-10, 2013.

ALOMAR, Soha A. Clinical manifestation of central nervous system tumor. In: **Seminars in diagnostic pathology**. WB Saunders, 2010. p. 97-104.

ANANTA, Jeyarama S.; PAULMURUGAN, Ramasamy; MASSOUD, Tarik F. Nanoparticle-delivered antisense microRNA-21 enhances the effects of temozolomide on glioblastoma cells. **Molecular pharmaceutics**, v. 12, n. 12, p. 4509-4517, 2015.

AUNG, Thazin Nwe et al. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 656, 2017.

BANERJI, Biswadip, et al. Synthesis of triazole-substituted quinazoline hybrids for anticancer activity and a lead compound as the EGFR blocker and ROS inducer agent. **ACS omega**, v. 3, n. 11, p. 16134-16142, 2018.

BAR, Fatma M. Abdel et al. Design and pharmacophore modeling of biaryl methyl eugenol analogs as breast cancer invasion inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 2, p. 496-507, 2010.

BARANIAK, Dagmara, et al. Nucleoside dimers analogues with a 1, 2, 3-triazole linkage: Conjugation of floxuridine and thymidine provides novel tools for cancer treatment. Part II. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 38, n. 11, p. 807-835, 2019.

BARREIRO, Eliezer J.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

BEGUM, Syeda Nurunnesa; RAY, Anindya Sundar; RAHAMAN, Chowdhury Habibur. A comprehensive and systematic review on potential anticancer activities of eugenol: From pre-clinical evidence to molecular mechanisms of action. **Phytomedicine**, p. 154456, 2022.

BENDRE, Ratnamala S. et al. Outlooks on medicinal properties of eugenol and its synthetic derivatives. **Nat Prod Chem Res**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2016.

BENISTY, Hannah et al. Mutation bias within oncogene families is related to proliferation-specific codon usage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 48, p. 30848-30856, 2020.

BERRIDGE, Michael V.; TAN, An S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,

5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.

BEZERRA, Daniel Pereira et al. The dual antioxidant/prooxidant effect of eugenol and its action in cancer development and treatment. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1367, 2017.

BOCCELLATO, Chiara; REHM, Markus. Glioblastoma, from disease understanding towards optimal cell-based in vitro models. **Cellular Oncology**, v. 45, n. 4, p. 527-541, 2022.

BOZOROV, Khurshed; ZHAO, Jiangyu; AISA, Haji A. 1, 2, 3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 27, n. 16, p. 3511-3531, 2019.

BRAY, Freddie et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n. 16, p. 3029-3030, 2021.

CAMPOS-SANDOVAL, José A. et al. Antioxidant responses related to temozolomide resistance in glioblastoma. **Neurochemistry International**, v. 149, p. 105136, 2021.

CARRASCO A, H. et al. Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cells (Part I). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 543-548, 2008.

CARRASCO, Héctor et al. Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1002-1024, 2012.

CAPONERO, RICARDO. Biologia do câncer. **CARVALHO et al., Temas em psico-oncologia. Summus**, p. 32-39, 2008.

CHEN, Fei et al. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. **Biotechnology and bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 30-39, 2009.

CHINEMBIRI, Tawona N. et al. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 11679-11721, 2014.

CLANCY, Hannah et al. Glioblastoma cell migration is directed by electrical signals. **Experimental Cell Research**, v. 406, n. 1, p. 112736, 2021.

COSTA, Antônio Luiz Silveira Vilanova et al. Estudo de técnicas multivariadas para seleção de variáveis em grandes bancos de dados: uma aplicação envolvendo dados de inibição (IC50). **Sigmae**, v. 9, n. 2, p. 63-70, 2020.

DA SILVA, Francisco Felipe Maia et al. Eugenol derivatives: Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. **Chemistry Central Journal**, v. 12, p. 1-9, 2018.

DAVIS, Mary Elizabeth. Glioblastoma: overview of disease and treatment. **Clinical journal of oncology nursing**, v. 20, n. 5, p. S2, 2016.

DE ALMEIDA LIMA, Graziela Domingues et al. Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1, 2, 3-triazolic portions. **Toxicology in Vitro**, v. 53, p. 1-9, 2018.

DE MORAES, Fabio Ynoe; LAPERRIERE, Normand. Glioblastoma in the elderly: initial management. **Chin Clin Oncol**, v. 6, n. 4, p. 39, 2017.

DE OLIVEIRA, André S. et al. Discovery of novel West Nile Virus protease inhibitor based on isobenzonafuranone and triazolic derivatives of eugenol and indan-1, 3-dione scaffolds. **PLoS One**, v. 14, n. 9, p. e0223017, 2019.

DE SA JUNIOR, Paulo Luiz et al. Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell in vitro. **Phytomedicine**, v. 23, n. 7, p. 725-735, 2016.

DHEER, Divya; SINGH, Virender; SHANKAR, Ravi. Medicinal attributes of 1, 2, 3-triazoles: Current developments. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 30-54, 2017.

DODURGA, Yavuz; SEÇME, Mücahit; ŞATIROĞLU-TUFAN, N. Lale. A novel oncogene URG4/URGCP and its role in cancer. **Gene**, v. 668, p. 12-17, 2018.

DO VALE, Juliana Alves et al. Synthesis of cinnamic acid ester derivatives with antiproliferative and antimetastatic activities on murine melanoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 148, p. 112689, 2022.

DOS REIS, Roberta Cristina Novaes et al. Potenciais aplicações medicinais de compostos 1, 2, 3-triazólicos: uma revisão. **HU Revista**, v. 48, p. 1-15, 2022.

FANGJUN, Li; ZHIJIA, Yang. Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells. **Thoracic cancer**, v. 9, n. 1, p. 25-29, 2018.

FIDLER, Miranda M.; BRAY, Freddie; SOERJOMATARAM, Isabelle. The global cancer burden and human development: A review. **Scandinavian journal of public health**, v. 46, n. 1, p. 27-36, 2018.

FONSECA, S. **Compostos organosselênio derivados da crisina e do cardanol: novas mensagens semi-sintéticas com atividades farmacológicas**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, p.114. 2017.

FRANCESCHI, Enrico et al. Rare primary central nervous system tumors in adults: an overview. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 996, 2020.

FREITAS, Luiza Baptista de Oliveira et al. A reação "click" na síntese de 1, 2, 3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. **Química Nova**, v. 34, p. 1791-1804, 2011.

GAZOLLA, Poliana Aparecida Rodrigues et al. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1, 2, 3-triazólicos. **Química Nova**, v. 41, p. 497-506, 2018.

GILARD, Vianney et al. Diagnosis and management of glioblastoma: A comprehensive perspective. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 4, p. 258, 2021.

GHOSH, Rita et al. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5812-5819, 2005.

GHOSH, Rita et al. Combination of 2-methoxyestradiol (2-ME2) and eugenol for apoptosis induction synergistically in androgen independent prostate cancer cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 113, n. 1-2, p. 25-35, 2009.

GHODOUSI-DEHNAVI, Elham et al. A Metabolomic Investigation of Eugenol on Colorectal Cancer Cell Line HT-29 by Modifying the Expression of APC, p53, and KRAS Genes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.

2021, p. 1-9, 2021.

GORRINI, Chiara; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-947, 2013.

GÓMEZ-VEGA, Juan Carlos; OCAMPO NAVIA, María Isabel; FEO LEE, Oscar. Epidemiología y caracterización general de los tumores cerebrales primarios en el adulto. **Universitas medica**, v. 60, n. 1, p. 47-60, 2019.

GONZÁLEZ ESCOBAR, Raimara. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Revista cubana de Estomatología**, v. 39, n. 2, p. 139-156, 2002.

GUO, Zongru. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119-136, 2017.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAYON, Tamar et al. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 44, n. 11, p. 1957-1962, 2003.

HOLLAND, Eric C. Glioblastoma multiforme: the terminator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 12, p. 6242-6244, 2000.

HUSSAIN, Arif et al. Eugenol enhances the chemotherapeutic potential of gemcitabine and induces anticarcinogenic and anti-inflammatory activity in human cervical cancer cells. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 26, n. 5, p. 519-527, 2011.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Como surge o câncer?. 2022. Disponível online em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>. Acessado em: 02/05/2023

JAGANATHAN, Saravana Kumar; SUPRIYANTO, Eko. Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6290-6304, 2012.

KABUTO, Hideaki; TADA, Mika; KOHNO, Masahiro. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. **Biological and**

**Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 423-427, 2007.

KARAVASILOGLOU, Nena et al. Sustainable Diets and Cancer: a Systematic Review. **Current Nutrition Reports**, p. 1-11, 2022.

KIM, Eun-Mi, et al. Synthesis of Tc-99m labeled 1, 2, 3-triazole-4-yl c-met binding peptide as a potential c-met receptor kinase positive tumor imaging agent. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 14, p. 4240-4243, 2010.

KONTOMANOLIS, Emmanuel N. et al. Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. *Anticancer research*, v. 40, n. 11, p. 6009-6015, 2020.

KUMAR, Rajiv, et al. Design and synthesis of novel benzenesulfonamide containing 1, 2, 3-triazoles as potent human carbonic anhydrase isoforms I, II, IV and IX inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 155, p. 545-551, 2018.

LAGOA, Ricardo et al. Advances in phytochemical delivery systems for improved anticancer activity. **Biotechnology advances**, v. 38, p. 107382, 2020.

LAHLOU, Mouhssen. The success of natural products in drug discovery. 2013.

LAU, Kristie H.; TAN, Alexandra M.; SHI, Yihui. New and emerging targeted therapies for advanced breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2288, 2022.

LEBEL, Andréa A. et al. Molecular characterization of the anticancer properties associated with bee venom and its components in glioblastoma multiforme. **Chemico-Biological Interactions**, v. 347, p. 109622, 2021.

LEDUR, Pítia Flores. Prevalência de OPCS (células precursoras de oligodendrócitos) em gliomas é determinante para o estabelecimento de condições autênticas de cultivo e para a identificação de alvos terapêuticos. 2015.

LI, Zhenjiang et al. Apoptotic induction and anti-metastatic activity of eugenol encapsulated chitosan nanopolymer on rat glioma C6 cells via alleviating the MMP signaling pathway. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, p. 111773, 2020.

LI, Yajuan et al. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs-mediated cancer

metastasis. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 58, n. 4, p. 200-207, 2019.

LIANG, Wei-Zhe et al. The involvement of mitochondrial apoptotic pathway in eugenol-induced cell death in human glioblastoma cells. **Toxicology letters**, v. 232, n. 1, p. 122-132, 2015.

LIMA, Ângela et al. Synthesis of eugenol-fluorinated triazole derivatives and evaluation of their fungicidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, p. 1200-1210, 2022.

LIU, Qiao et al. Berberine Induces Senescence of Human Glioblastoma Cells by Downregulating the EGFR–MEK–ERK Signaling Pathway Berberine Induces Senescence of Glioma Cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 355-363, 2015.

LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, p. 803-820, 2016.

MAGHE, Clément et al. MALT1 in glioblastoma: the Flowers of Evil. **Medicine sciences: M/S**, v. 36, n. 5, p. 452-454, 2020.

MAJEED, Hamid; ANTONIOU, John; FANG, Zhong. Apoptotic effects of eugenol-loaded nanoemulsions in human colon and liver cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 21, p. 9159-9164, 2014.

MAJHI, Sasadhar; DAS, Debjit. Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects-A decade update. **Tetrahedron**, v. 78, p. 131801, 2021.

MANIKANDAN, Palrasu et al. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. **Life sciences**, v. 86, n. 25-26, p. 936-941, 2010.

MARUMOTO, Tomotoshi; SAYA, Hideyuki. Molecular biology of glioma. **Adv Exp Med Biol**, v. 746, n. 2, p. 11, 2012.

MILLER, Kimberly D. et al. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 5, p. 381-406, 2021.

MELO, Júlio OF et al. Heterociclos 1, 2, 3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 569-579, 2006.

MELLO, Rodrigo Brito de. **Produção de biblioteca de compostos derivados de produtos naturais: síntese e estudo de atividades biológicas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MIRAGHAJANI, Maryam et al. Aged garlic and cancer: A systematic review. **International journal of preventive medicine**, v. 9, 2018.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAJMAN, Henry; GADELHA, Maria Inez Pordeus. Temozolamida. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 439-445, 2002.

NALLI, Marianna et al. Emerging therapeutic agents for colorectal cancer. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7463, 2021.

NETTO, Jairo Batista; SILVA, Thamyres Figueredo; DO NASCIMENTO, Gabriel Vinicius Ferreira. Glioblastoma: patogênese e tratamento. Revisão da literatura. **JBNC-JORNAL BRASILEIRO DE NEUROCIRURGIA**, v. 30, n. 3, p. 233-243, 2019.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NISAR, Muhammad Farrukh et al. Pharmacological properties and health benefits of eugenol: A comprehensive review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2007.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Câncer. 2018. Disponível online: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). Acessado em 04/05/2023.

OSTROM, Quinn T. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012–2016.

**Neuro-oncology**, v. 21, n. Supplement\_5, p. v1-v100, 2019.

OUYANG, Ting et al. Recent trends in click chemistry as a promising technology for virus-related research. **Virus research**, v. 256, p. 21-28, 2018.

PADHY, Ipsa et al. Molecular mechanisms of action of Eugenol in cancer: Recent trends and advancement. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1795, 2022.

PAN, Li; CHAI, Heebyung; KINGHORN, A. Douglas. The continuing search for antitumor agents from higher plants. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2010.

PARK, Moon Nyeo et al. Review of natural product-derived compounds as potent antiglioblastoma drugs. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

PEREIRA, Edmundo Luís Rodrigues et al. A Nova Classificação OMS dos Tumores do Sistema Nervoso. O que neurocirurgiões precisam saber. **JBNC-JORNAL BRASILEIRO DE NEUROCIRURGIA**, v. 29, n. 3, p. 545-552, 2019.

PERMATASARI, Happy Kurnia et al. Eugenol isolated from *Syzygium aromaticum* inhibits HeLa cancer cell migration by altering epithelial-mesenchymal transition protein regulators. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 11, n. 5, p. 049-053, 2021.

PERMATASARI, Happy Kurnia; KUSUMA, Ihda Dian; MAYANGSARI, Elly. Minyak Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) menginduksi apoptosis pada sel kanker servik HeLa melalui peningkatan kadar protein p53. **Jurnal Kedokteran Brawijaya**, v. 30, n. 3, p. 185-190, 2019.

PETROCELLI, Giovannamaria et al. Molecules present in plant essential oils for prevention and treatment of colorectal cancer (CRC). **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 885, 2021.

PISANO, Marina et al. Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells. **Molecular cancer**, v. 6, p. 1-12, 2007.

PLA, Luis et al. A gated material as immunosensor for in-tissue detection of IDH1-R132H mutation in gliomas. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130406, 2021.

POON, Michael TC et al. Temozolomide sensitivity of malignant glioma cell lines—a systematic review assessing consistencies between in vitro studies. **BMC cancer**, v. 21, p. 1-9, 2021.

RAJORIYA, Shweta et al. Study on effect of eugenol on anti-metastatic activity and expression of MMPS in TNBC MDA MB: 231 cell line. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 4, p. 788-794, 2019.

RASUL, Hezha O. et al. In silico molecular docking and dynamic simulation of eugenol compounds against breast cancer. **Journal of molecular modeling**, v. 28, n. 1, p. 17, 2022.

RODRIGUES, Michelle Peixoto et al. Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 111688, 2019.

RÖHRIG, Ute F., et al. 1, 2, 3-Triazoles as inhibitors of indoleamine 2, 3-dioxygenase 2 (IDO2). **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n. 17, p. 4330-4333, 2016.

ROMANI, Massimo; PISTILLO, Maria Pia; BANELLI, Barbara. Epigenetic targeting of glioblastoma. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 448, 2018.

RUANO-RAVINA, Alberto et al. Radon exposure and tumors of the central nervous system. **Gaceta Sanitaria**, v. 32, p. 567-575, 2019.

SALARI, Nader et al. Anti-cancer activity of chrysin in cancer therapy: a systematic review. **Indian Journal of Surgical Oncology**, p. 1-10, 2022.

SANPHANYA, Kingkan, et al. Novel VEGFR-2 kinase inhibitors identified by the back-to-front approach. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 10 (2013): 2962-2967, 2013.

SCHOR, Nina F. Pharmacotherapy for adults with tumors of the central nervous system. **Pharmacology & therapeutics**, v. 121, n. 3, p. 253-264, 2009.

SILVA, Evelyn Winter da et al. Mecanismos de citotoxicidade de chalconas isoladas e encapsuladas em nanopartículas lipídicas sobre uma linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda e identificação de novos inibidores da proteína de resistência ABCG2. 2013.

SILVA, Francisco Felipe Maia da. Síntese, caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano e antioxidante de derivados do Eugenol e processos biocatalíticos usando casca da laranja. 2017.

SINGH, Simranjit X. et al. Inhibiting adenine synthesis attenuates glioblastoma cell stemness and temozolomide resistance. **bioRxiv**, p. 2021.06. 21.449341, 2021.

SHIN, Sang-Hun et al. The mechanism of apoptosis induced by eugenol in human osteosarcoma cells. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 33, n. 1, p. 20-27, 2007.

SOUSA, Sara Maria Ribeiro de et al. SÍNTESE DE NOVOS 1, 2, 3-TRIAZÓIS INSPIRADOS NO SRPIN340 E AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOBLASTOMA HUMANO. *Química Nova*, v. 44, p. 1268-1279, 2021.

SOUZA, Marcus Vinícius Nora de et al. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. **Revista Fitos**, v. 3, n. 02, p. 25-42, 2007.

SOUZA, R. **Potencial antioxidante, antitumoral e antifúngico de constituintes de óleos essenciais**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)- Universidade Federal de Lavras. Lavras, p. 125. 2018.

STARK, Andreas Martin et al. Glioblastoma of the cerebellum and brainstem. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 1248-1251, 2010.

SZNARKOWSKA, Alicja et al. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15996, 2017.

TAN, Aaron C. et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 70, n. 4, p. 299-312, 2020.

TEIXEIRA, Róbson Ricardo et al. Synthesis and antiproliferative activity of C-3 functionalized isobenzofuran-1(3H)-ones. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1881-1896, 2013.

TEIXEIRA, Róbson Ricardo et al. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1, 2, 3-triazole functionalities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 274-286, 2018.

THANKA, J.; PARIJATHAM, BO; PRIYA, V. Estudo Clínico Patológico das Neoplasias do Sistema Nervoso Central. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 33, n. 21B, pág. 64-76, 2021.

TRAMONTINA, Ana Carolina. Efeito da fluoxetina e serotonina sobre a secreção de S100B em culturas de astrócitos e fatias hipocâmpais de ratos. 2008.

TRIPOLSZKY, Anna et al. Synthesis of (1, 2, 3-triazol-4-yl) methyl phosphinates and (1, 2, 3-triazol-4-yl) methyl phosphates by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2085, 2019.

TURKEZ, Hasan et al. Promising potential of boron compounds against Glioblastoma: In Vitro antioxidant, anti-inflammatory and anticancer studies. **Neurochemistry international**, v. 149, p. 105137, 2021.

ULANOWSKA, Magdalena; OLAS, Beata. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3671, 2021.

USTA, J. et al. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 935-940, 2002.

VICTORIA, Francine Novack et al. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience letters**, v. 544, p. 105-109, 2013.

VILLA, Chiara et al. The 2016 World Health Organization classification of tumours of the central nervous system. **La Presse Médicale**, v. 47, n. 11-12, p. e187-e200, 2018.

ZAKIRYANOVA, Gulnur K.; WHEELER, Sarah; SHURIN, Michael R. Oncogenes in immune cells as potential therapeutic targets. **ImmunoTargets and therapy**, p. 21-28, 2018.

ZARI, Ali T.; ZARI, Talal A.; HAKEEM, Khalid Rehman. Anticancer properties of eugenol: A review. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7407, 2021.

ZENGIN KURT, Belma et al. Synthesis, anticholinesterase activity and molecular modeling studies of novel carvacrol-substituted amide derivatives. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, n. 3, p. 841-859, 2020.

WELLER, Michael et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 18, n. 3, p. 170-186, 2021.

WILSON, Taylor A.; KARAJANNIS, Matthias A.; HARTER, David H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. **Surgical neurology international**, v. 5, 2014.

WIRSCHING, Hans-Georg; WELLER, Michael. Glioblastoma. **Malignant Brain Tumors: State-of-the-Art Treatment**, p. 265-288, 2017.

WON, Moo Ho et al. Postischemic hypothermia induced by eugenol protects hippocampal neurons from global ischemia in gerbils. **Neuroscience letters**, v. 254, n. 2, p. 101-104, 1998.

WU, Wei et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. **Pharmacological Research**, v. 171, p. 105780, 2021.

XIAO, Shuai et al. Roles of oncogenes in esophageal squamous cell carcinoma and their therapeutic potentials. **Clinical and Translational Oncology**, p. 1-14, 2022.

YAN, Xianxin et al. Eugenol inhibits oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation via downregulation of c-Myc/PGC-1 $\beta$ /ERR $\alpha$  signaling pathway in MCF10A-ras cells. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 12920, 2017.

YANG, Xiaodong. Clonogenic assay. *Bio-protocol*, v. 2, n. 10, p. e187-e187, 2012.

YAO, Maojin et al. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. **Cellular & molecular immunology**, v. 15, n. 8, p. 737-739, 2018.

YOGALAKSHMI, Baskaran; VISWANATHAN, Periyasamy; ANURADHA, Carani Venkatraman. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. **Toxicology**, v. 268, n. 3, p. 204-212, 2010.

YOO, Chae-Bin et al. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer letters**, v. 225, n. 1, p. 41-52, 2005