



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MARIA FRANCILENE SOUZA SILVA**

**PERFIL METABOLÔMICO E POTENCIAL CITOTÓXICO DE *Phyllanthus* spp.**  
**(*Phyllanthus amarus* SCHUM. & THONN. E *P. niruri* L.)**

**FORTALEZA**  
**2019**

MARIA FRANCILENE SOUZA SILVA

PERFIL METABOLÔMICO E POTENCIAL CITOTÓXICO DE *Phyllanthus* spp.  
(*Phyllanthus amarus* SCHUM. & THONN. E *P. niruri* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.  
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S239p Silva, Maria Francilene Souza.  
Perfil metabolômico e potencial citotóxico de *Phyllanthus* spp. (*Phyllanthus amarus* Schum. & thonn. e *P. niruri* L.) / Maria Francilene Souza Silva. – 2019.  
159 f.: il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Cláudia do Ó Pessoa.

Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

1. Desreplicação. 2. Metabolômica. 3. Quebra-pedra. 4. Citotoxicidade. 5. Câncer. I. Título.

CDD 660.6

---

MARIA FRANCILENE SOUZA SILVA

PERFIL METABOLÔMICO E POTENCIAL CITOTÓXICO DE *Phyllanthus* spp.

(*Phyllanthus amarus* SCHUM. & THONN. E *P. niruri* L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia de Produtos Naturais.

Aprovada em: 27/03/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Cláudia do Ó Pessoa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Guilherme Julião Zocolo (Co-orientador)  
Embrapa AgroindústriaTropical (EMBRAPA)

---

Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida  
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

---

Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Edy Sousa de Brito  
Embrapa AgroindústriaTropical (EMBRAPA)

---

Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, essa força maior que está sempre presente em minha vida, me guiando nas decisões, escolhas e sempre proporcionou o melhor para minha vida.

À minha mãe Ana Ceres, por todo o amor dedicado, pelo apoio constante em todas as decisões da minha vida. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos, por se exemplo de mulher guerreira e batalhadora, um dos corações mais gigantes que já conheci.

A meu pai Deusdete, pelo carinho e amor sempre dedicado. Pelas ligações nos finais de semana, mesmo que curtas, mas sempre querendo saber se estava tudo bem.

À Ivanilza Andrade pela amizade desde a graduação em todo esse período de pós-graduação, pelo incentivo desde sempre para que continuasse na área acadêmica, pelos conselhos que serviram para minhas escolhas e ajuda para enfrentar os desafios.

À Profa Claudia Pessoa, por aceitar me orientar mesmo sem me conhecer e por ser essa pessoa de coração gigante. Por sempre incentivar seus alunos a buscar novos desafios, novos aprendizados e pela amizade desenvolvida ao longo desses quatro anos.

A Guilherme Zocolo, pela orientação, paciência, motivação, amizade e por sempre estar disponível a ajudar. Agradeço imensamente a compreensão em vários momentos dessa trajetória, espero ser um terço do exemplo que ele é como orientador e como pessoa.

Aos pesquisadores Kirley Canuto e Edy Brito, por todo apoio no desenvolvimento das pesquisas no LMQPN-EMBRAPA e contribuições na elaboração da tese.

À Lorena Mara, por sempre estar disposta a tirar dúvidas, pela grande ajuda na parte química e contribuições no trabalho como um todo.

À minha família, avó, tios, tias, primas e agregados por sempre torcerem por mim e por todo o amor existente na nossa família.

À Francimere Costa e Carpegiane, pela amizade desde a graduação, por me acolher e fazer com que minha chegada fosse a melhor possível. Obrigada pelo apoio sempre.

Às minhas amigas “cafussuzinhas”, Cássia, Cláudia e Andréa por tornarem essa trajetória menos árdua com a amizade de vocês. Acredito em anjos e elas foram anjos que Deus colocou em minha vida, para que eu pudesse enfrentar todo o medo do novo. Claudia e Cássia saibam que vocês foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada por todos os ensinamentos, amizade e por fazerem eu me sentir como membro da família de vocês.

Ao Daniel Pascoalino, pessoinha que foi muito presente na minha vida durante esses últimos anos doutorado, por sempre estar disposto a ajudar, sempre perguntando como estava a tese, se precisava de ajuda e por ter o coração gigante.

Ao Bruno Soares, esse serzinho de luz que sempre me proporcionou momentos maravilhosos de amizade e companheirismo.

A minhas the bests, Jaqueline Santos, Samara Gonçalves, Ivy Nery e Emanuelly Arruda pela amizade desde a graduação, pelos momentos de descontração, mesmo que via WhatsApp, e por todo apoio durante toda essa trajetória.

À Aliny Nunes e Adriana Sousa, por toda ajuda e ensinamentos quando cheguei à EMBRAPA, foram essenciais para que eu pudesse dar prosseguimento ao trabalho de tese.

À Silvana França, pela amizade, pelas viagens e momentos de descontração. Saiba que quero você e sua família sempre na minha vida.

À D. Nancy, João Ernesto, Nancyzinha e Paulo Augusto, por sempre me apoiar na minha formação acadêmica e profissional.

A todos os amigos Loeanos (Bruno, Gabriel, José Neto, Daisy, Sarah, Lucas, Renan, Cris, Júlia, Guto), por serem como uma família, pelos momentos de descontração e ensinamentos. Levarei essa energia e amizade para sempre e espero que tenhamos ainda muitos encontros pela vida a fora.

A todos meus grandes amigos e amigas que sempre estiveram presentes na minha vida e torceram por mim, mesmo que de longe.

Aos órgãos de fomento, CAPES por subsidiar o projeto de pesquisa e Funcap pela concessão de bolsa de pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará e RENORBIO, pela formação de recursos humanos e preparação para o caminho profissional.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical por todo suporte e apoio para realização das atividades de pesquisa. Aos técnicos Paulo Riceli e Tigressa pelas valiosas contribuições na execução dos experimentos.

## RESUMO

O gênero *Phyllanthus* pertence à família Phyllanthaceae, inclui-se no *Phyllanthus amarus* e *P. niruri*, conhecidas como quebra-pedra. A utilização de produtos naturais e novos compostos químicos a fim de descobrir e desenvolver novos medicamentos está em foco na atualidade. Estratégias modernas como desreplicação visam acelerar a identificação de compostos conhecidos presentes em um extrato bruto ou parcialmente purificado. Desta forma, o presente estudo visa avaliar o potencial tecnológico de *P. amarus* e *P. niruri*, investigando a influência da extração em fase sólida (EFS) sobre a citotoxicidade e perfis químicos de UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> e RMN de extratos aquosos das duas espécies, bem como o fracionamento via HPLC preparativo, correlacionando os perfis químicos das frações com atividade biológica. O monitoramento científico e tecnológico foi realizado com base em artigos encontrados em periódicos nas bases *Web of Science* e *NCBI (PUBMED)* e nas bases de patentes ESPACENET, GooglePatents e INPI. A análise de monitoramento científico e tecnológico demonstrou o potencial farmacológico de *P. amarus* e *P. niruri* como agentes para o tratamento de diferentes tipos de doenças e possibilidades de ensaios clínicos em diversas áreas da saúde. A EFS foi realizada com cartuchos Oasis, Plexa e Agilent C18 com e sem modificadores orgânicos. Como resultados verificou-se diferenças entre os cartuchos SPE e a massa recuperada, permitiram a exploração das diferentes funcionalidades químicas das espécies de *Phyllanthus*. As amostras de SPE apresentaram maior citotoxicidade *in vitro* do que os extratos brutos. Utilizou-se HPLC preparativo para o fracionamento dos extratos e a composição química foi determinada por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> e RMN, em conjunto com técnicas quimiométricas (PCA e PLS). A atividade biológica foi testada num painel de linhagens tumorais e não tumoral, pelo ensaio do MTT e foram realizadas análises de citometria de fluxo, tais como ensaios de proliferação celular, integridade de membrana, ciclo celular, potencial transmembrânico mitocondrial e mecanismo de morte. A variabilidade da composição química das frações demonstrou que as frações 4 e 5 das duas espécies analisadas via UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> e RMN apresentaram maior teor de compostos químicos. A fração *PhyN Fr. 4n* (*P. niruri*- fração 4) apresentou maior atividade citotóxica frente a linhagem HL60 e os testes de citometria demonstraram que após 24 h de tratamento a fração *PhyN Fr. 4n* apresentou redução progressiva do número de células nas concentrações testadas e a viabilidade celular reduzida em concentração dependente. Na avaliação de morte celular, *PhyN Fr. 4n* nas concentrações de 47 e 70,5 µg / mL, apresentou aumento significativo de células em apoptose tardia. Morfologicamente as células tratadas apresentaram características de morte por apoptose e/ou necrose. A fração *PhyN Fr. 4n* prende

as células na fase S a concentrações de 47 e 70,5 µg/mL. A fração 4n apresenta como metabólitos maior intensidade o Ácido repandusinico – isômero I (**1**) e II (**3**), Breviflorina ácido carboxílico (**2**), corilagina (**4**), corilagina-isômero (**5**) e geraniina- isômero II (**16**). Podemos verificar neste estudo que as espécies de *Phyllanthus* apresentam grande potencial químico e farmacológico a ser explorado quanto a pesquisa com drogas anticâncer.

**Palavras-chave:** Desreplicação. Metabolômica. Quebra-pedra. Citotoxicidade. Câncer.

## ABSTRACT

The genus *Phyllanthus* belongs to Phyllanthaceae family, including the species *Phyllanthus amarus* and *P. niruri*, known as “quebra-pedra”. The use of natural products and its new chemical structures to develop new drugs are in focus the last years. New strategies as dereplication aim to fast the identification of the compounds from a crude extract or partial purified. The current study aims to evaluate the technological potential of *P. amarus* and *P. niruri* investigating the influence of solid phase extraction (SPE) under its cytotoxic and chemical profile. The studies were performed using UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> and RMN of aqueous extracts of the two species, as well as fractionation by preparative HPLC, correlating the chemical profiles of the fractions with biological activity. The scientific and technological monitoring was carried out based on articles found in periodicals in the *Web of Science e NCBI (PUBMED)* and patent basis ESPACENET, GooglePatents and INPI. The analysis of scientific and technological monitoring demonstrated the pharmacological potential of *P. amarus* and *P. niruri* as agents for the treatment of different types of diseases and possibilities of clinical trials in several health areas. The SPE was performed with Oasis, Plexa and Agilent C18 cartridges with and without organic modifiers. As results showed differences between the SPE cartridges and the recovered mass, allowed the exploration of the different chemical functionalities of the *Phyllanthus* species. The SPE samples showed higher in vitro cytotoxicity than the crude extracts. Preparative HPLC was used for fractionation of the extracts and the chemical composition was determined by UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> and NMR, together with chemometric techniques (PCA and PLS). Biological activity was tested on a panel of tumor and non-tumor cell lines by the MTT assay and flow cytometric assays were performed, such as cell proliferation assays, membrane integrity, cell cycle, mitochondrial transmembrane potential and mechanism of death. The variability of the chemical composition of the fractions showed that fractions 4 and 5 of the two species analyzed by UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> and NMR showed higher content of chemical compounds. The *PhyN Fr. 4n* fraction (*P. niruri* fraction 4) showed higher cytotoxic activity against the HL60 line and the cytometric tests showed that after 24 h of treatment the *PhyN Fr. 4n* fraction presented progressive reduction of the number of cells at the tested concentrations and reduced cell viability in a dependent concentration. In the evaluation of cell death, *PhyN Fr. 4n* at concentrations of 47 and 70.5 µg / mL showed a significant increase of cells in late apoptosis. The *PhyN Fr. 4n* fraction binds cells in the S phase to concentrations of 47 and 70.5 µg / ml. Morphologically the treated cells presented apoptosis and / or necrosis death characteristics. The fraction *4n* present as metabolites of greater intensity

of repandusinic acid A-isomer I (**1**) and II (**3**) , brevifolin carboxylic acid (**2**), corilagin (**4**), corilagin-isomer (**5**) and geraniin- isomer II (**16**). We can verify in this study that the species of *Phyllanthus* present great chemical and pharmacological potential to be explored regarding the research with anticancer drugs.

**Keywords:** Dereplication. Metabolomic. “Quebra-pedra”. Cytotoxicity. Cancer.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Câncer: Histórico, incidência e estimativas.....	13
2.2	Carcinogênese: características.....	17
2.3	Ciclo celular e câncer.....	19
2.4	Morte celular e câncer.....	20
2.5	Produtos Naturais e Câncer.....	24
2.6	O gênero <i>Phyllanthus</i> L.....	26
2.6.1	<i>Phyllanthus amarus</i> Schumacher & Thonning.....	27
2.6.2	<i>Phyllanthus niruri</i> L.....	28
2.7	Aspectos farmacológicos de <i>Phyllanthus</i> spp.....	29
2.7.1	Aspectos farmacológicos de <i>Phyllanthus amarus</i> .....	16
2.7.2	Aspectos farmacológicos de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	31
2.8	Metabolômica.....	33
2.9	Desreplicação.....	36
3	OBJETIVOS .....	38
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
4	CAPÍTULO 1 - A SYSTEMATIC REVIEW ON BIOCHEMICAL AND PHARMACEUTIC PROPERTIES OF GENUS <i>Phyllanthus</i> spp.: FOCUS ON <i>P. amarus</i> AND <i>P. niruri</i> .....	39
5	CAPÍTULO 2 - UPLC-HRMS AND NMR APPLIED IN THE EVALUATION OF SOLID-PHASE EXTRACTION METHODS AS A RATIONAL STRATEGY OF DEREPLICATION OF <i>Phyllanthus</i> spp. AIMING AT THE DISCOVERY OF CYTOTOXIC METABOLITES.....	62
6	CAPÍTULO 3 - UPLC-HRMS AND NMR APPLIED TO BIOGUIDED FRACTION OF <i>Phyllanthus</i> spp.: CYTOTOXICITY EVALUATION AND DEREPLICATION APPROACH.....	95
7	CONCLUSÃO .....	131
	REFERÊNCIAS .....	132